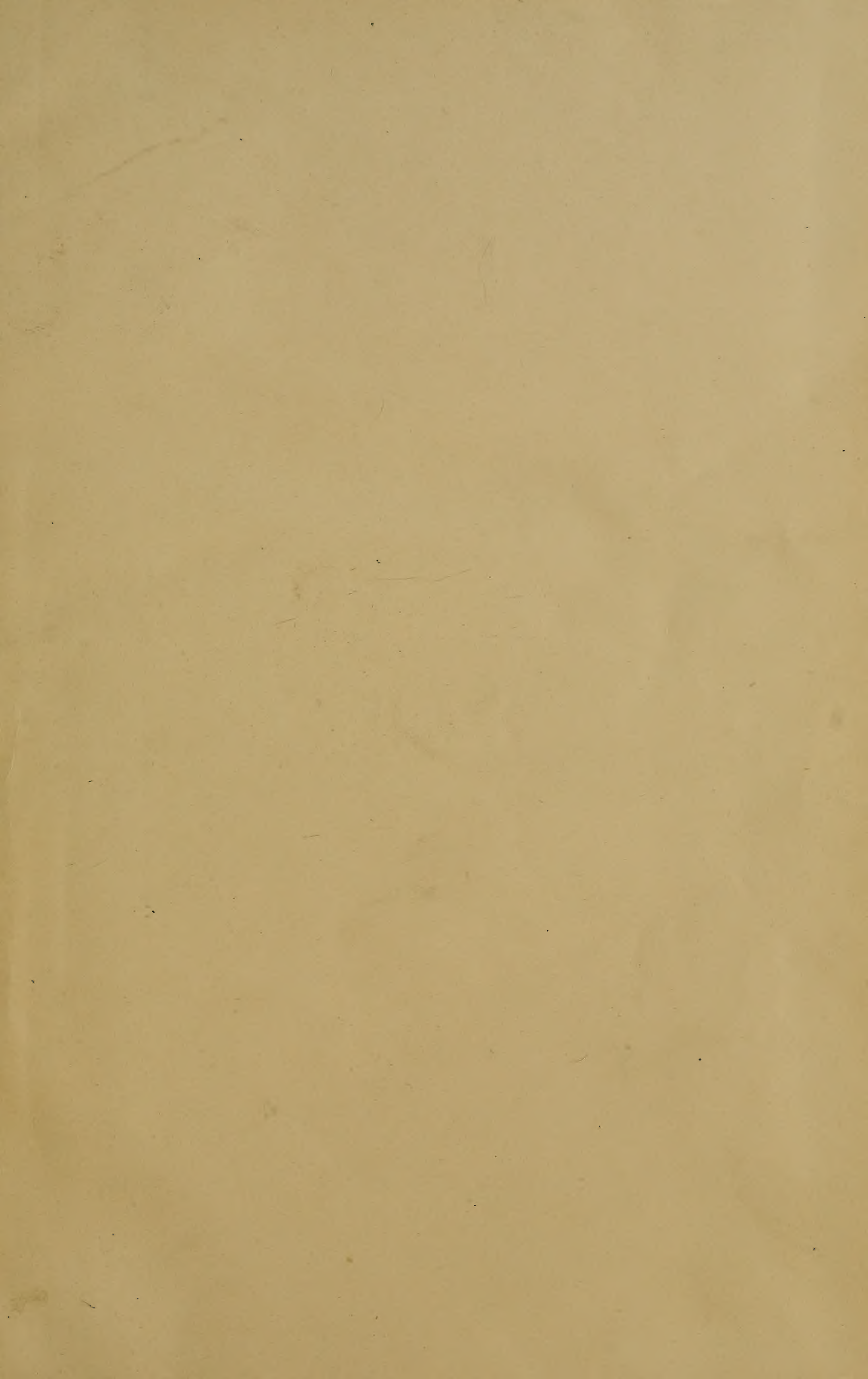
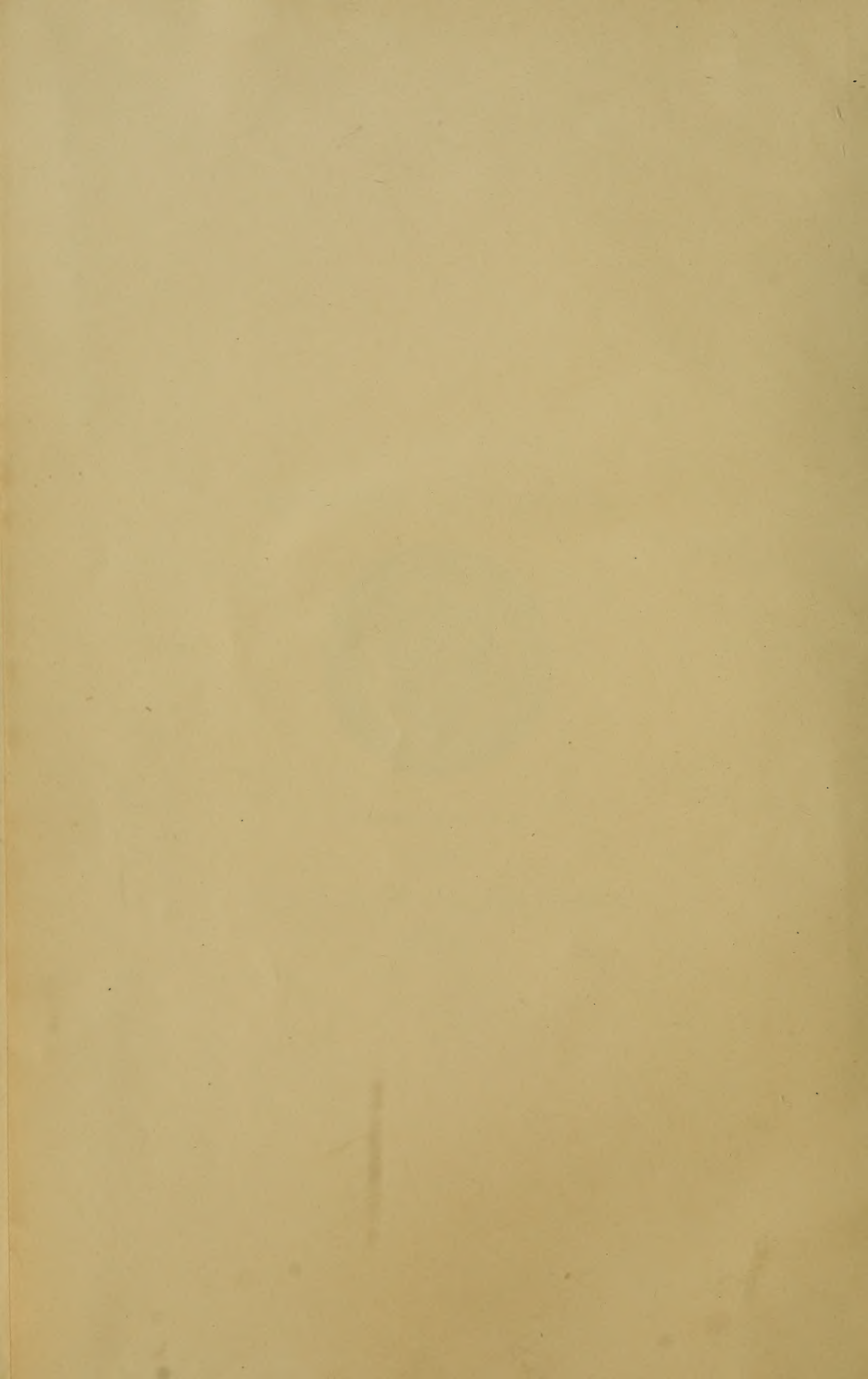
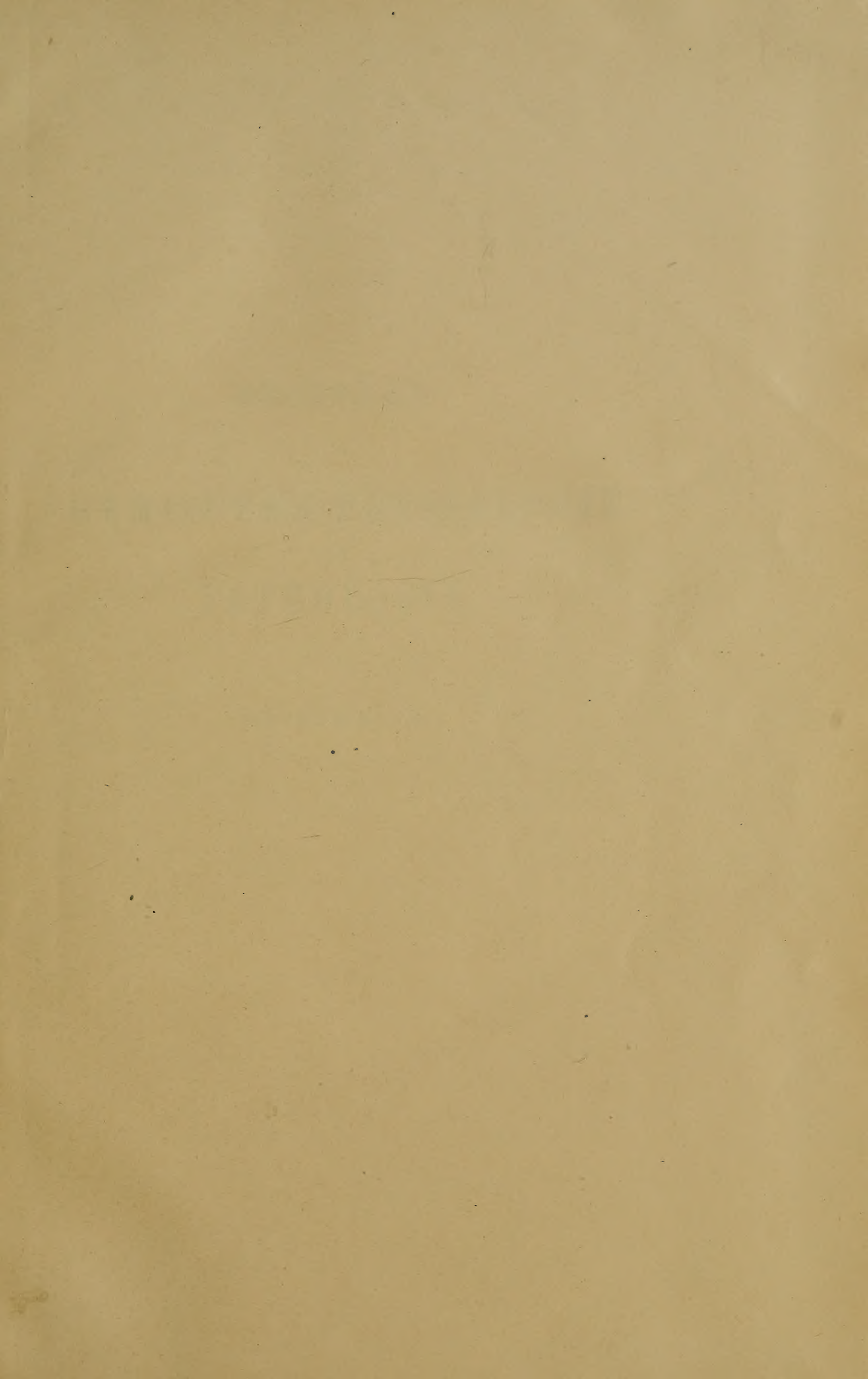
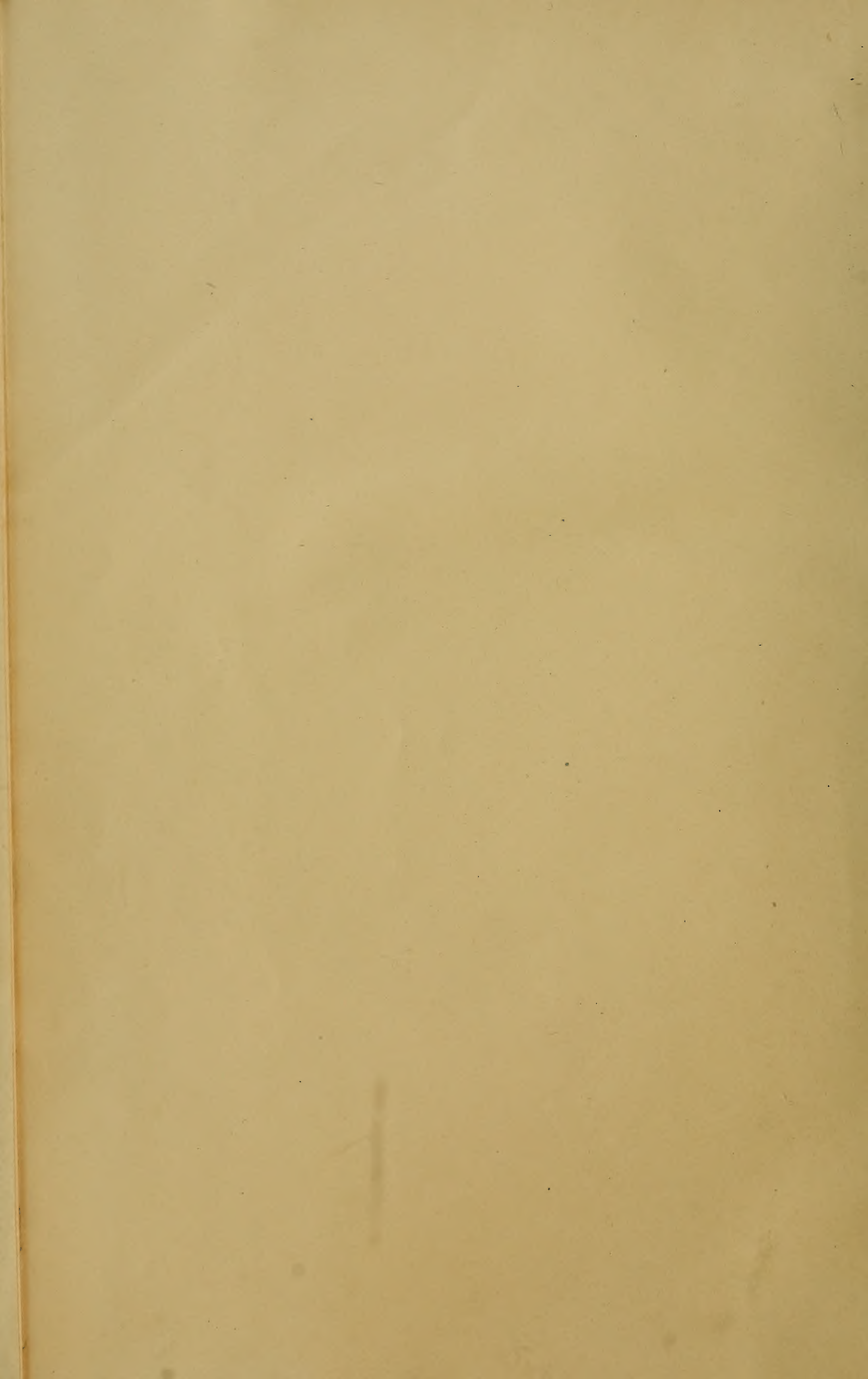










BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ELFTER BAND

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

ELFTER BAND

BRAUNSCHWEIG

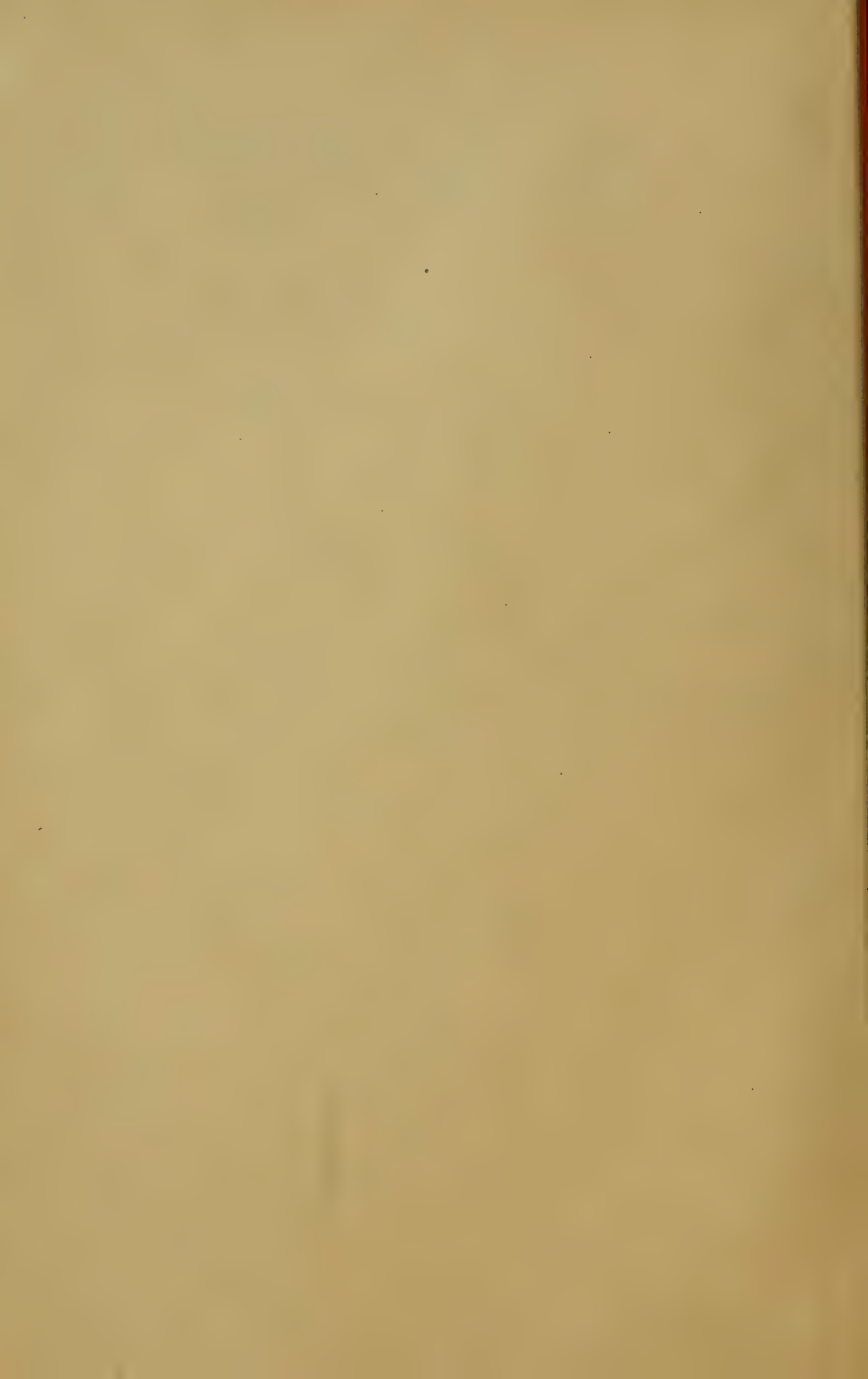
DRUCK UND VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1908

INHALT DES ELFTEN BANDES.

A. Abhandlungen.

B. Kürzere Mitteilungen.



Beiträge

zur

Chemischen Physiologie

und

Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

---

XI. Band 1. und 2. Heft

(Ausgegeben Dezember 1907)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1908

Inhalt des 1. und 2. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

I.

Über die Polypeptidphosphorsäure (Paranucleïnsäure) des Caseïns.

Von Dr. med. **Alfred Reh**, Kinderarzt in Straßburg.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut in Straßburg i. E.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der wissenschaftl. Gesellschaft zu Straßburg.)

1.

Das Caseïn der Milch gehört den phosphorhaltigen Eiweißstoffen, und zwar der kleinen, aber überaus wichtigen Gruppe an, die durch den Mangel von Nucleïnbasen ausgezeichnet ist. Es ist ein bemerkenswertes Zusammentreffen, daß die meisten von den dieser Gruppe — „den Phosphorproteïden einschließlich der Phosphorglykoproteïde“ — angehörigen Eiweißkörpern, die Caseïne der Milch, die Vitelline der Vogeleier, die Ichthuline der Fischeier, der Ernährung des ganz jungen, in lebhaftestem Wachstum befindlichen Organismus dienen. Nun ist der Bedarf des jungen Organismus an phosphorhaltigen Verbindungen einerseits wegen der in diesem Stadium vor sich gehenden Knochenbildung, andererseits wegen der lebhaften Zellproliferation, die ja eine entsprechende Neubildung der phosphorhaltigen Nucleïnstoffe voraussetzt, besonders groß. Es liegt daher die Vermutung überaus nahe, daß der Phosphor in den Phosphorproteïden in einer für Knochenbildung und Gewebsansatz besonders geeigneten Form vorliegt. Die Aufklärung dieser Bindungsweise erscheint sonach als ein theoretisch und praktisch gleich wichtiges Problem.

Da das in der Milch aufgenommene Caseïn, ehe es im Körper zur Verwendung kommt, der Verdauung unterliegt, so liegt die Notwendigkeit vor, zunächst das Schicksal des betreffenden phosphorhaltigen Komplexes während der Verdauung — und zwar zunächst der Pepsinverdauung — zu untersuchen.

Salkowski[1]) gebührt das große Verdienst, die Aufklärung dieser Frage angebahnt zu haben. Er beseitigte das seit Ljubavins Untersuchungen eingebürgerte Vorurteil, daß der Phosphor des Caseïns bei der Magenverdauung nahezu ganz in einem unlöslichen und für weitere Verdauung schwer angreifbaren Produkt (dem Dyspepton Meissners, dem Paranucleïn späterer Autoren) zurückbleibt, indem er nachwies, daß unter günstigen Verdauungsbedingungen der größte Teil des Caseïnphosphors in organischer Form in Lösung geht und erklärte die abweichenden Resultate anderer Autoren durch die Wahl ungeeigneter Versuchsbedingungen und namentlich durch die Verwendung ungenügender Pepsinmengen. Daß die löslichen Verdauungsprodukte auch Phosphor enthalten, wurde auch von v. Moraczewski[2]), Krehl und Matthes[3]), und Alexander[4]) beobachtet. Alexander fand überdies, daß die zweite Ammonsulfatfraktion (obere Fällungsgrenze bei 72 Proz. Sättigung), die er als Deuteroalbumose A bezeichnet, einen auffällig hohen Phosphorgehalt aufwies. Ebenso konnte Alexander auch die Angabe Salkowskis bestätigen, daß eine Ausscheidung von „Paranucleïn" überhaupt nicht zu erfolgen braucht.

Salkowski wandte sich dann weiter der Untersuchung des phosphorhaltigen Verdauungsproduktes zu. Er konnte zunächst zeigen, daß der gesamte in der Verdauungslösung gelöste Phosphor organisch gebunden ist. Auf die hohe physiologische Bedeutung dieses Befundes weist er mit folgenden Worten hin: „Solange man annimmt, daß der Phosphor des Caseïns bei der Verdauung als Paranucleïn unlöslich abgespalten wird, ist nicht wohl einzusehen, zu welchem Zwecke das Caseïn phosphorhaltig ist — es müßte denn das Nucleïn im Darmkanal gespalten werden. Entstehen dagegen lösliche phosphorhaltige Verdauungsprodukte, so läßt sich wohl denken, daß dieselben bestimmte Funktionen haben, welcher Art sie auch sein mögen, sei es, daß sie ihre Wirkung im Darmkanal entfalten, sei es, daß sie, in die Blutbahn übergehend, in irgend einer Beziehung zur Zellenbildung im allgemeinen oder zur Knochenbildung stehen oder sonstige Allgemeinwirkung ausüben."

Die letzte einschlägige Arbeit Salkowskis: „Über die Paranucleïnsäure aus Caseïn"[5]) brachte einen wichtigen Fortschritt.

---

[1]) Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1893, Nr. 23 u. 28; Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**, 297; Salkowski und Hahn, Pflügers Archiv **59**, 225; ebenda **63**, 401.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **20**, 28.

[3]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. **36**, 439.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 411.

[5]) Ebenda **32**, 245.

Es gelang ihm, aus der Verdauungslösung des Caseïns ein phosphorreiches Verdauungsprodukt, zunächst als Eisenverbindung, dann in freiem Zustande zu isolieren und zur Analyse zu bringen. Nach seiner Beobachtung bleibt eine aus dem Caseïn durch zwei- bis dreitägige Verdauung erhaltene genau neutrale Lösung bei Zusatz einer nicht zu konzentrierten Lösung von Eisenammoniakalaun unverändert oder zeigt nur eine geringe Trübung; erhitzt man aber dann zum Sieden oder einige Zeit auf dem Wasserbade, so scheidet sich ein phosphorhaltiger Eisenniederschlag aus. Bei Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen gelang es, den organischen Phosphor bis auf bedeutungslose Reste auszufällen.

Der abfiltrierte, ausgewaschene und getrocknete Eisenniederschlag, der allerdings nicht ganz von Schwefelsäure befreit werden konnte, gab bei der Analyse folgende Werte: C 31,90 Proz., H 4,43 Proz., N 9,72 Proz., P 2,55 Proz., Fe 21,87 Proz.

Aus der Eisenverbindung isolierte dann Salkowski den phosphorhaltigen Komplex, die „Paranucleïnsäure“, in der Weise, daß er den feuchten Eisenniederschlag mit Wasser in der Reibschale zu einer ganz gleichmäßigen Suspension verrieb, bei Zimmertemperatur mit Halbnormallauge bis zur vollständigen Lösung durchrührte, bis zur Umsetzung erhitzte und nun möglichst schnell in einen Filtrierkolben, welcher etwa drei Viertel der zur Sättigung der Natronlauge erforderlichen Quantität Essigsäure enthielt, filtrierte. Das sauer reagierende Filtrat fällte er nunmehr mit Kupferacetat, zersetzte mit Schwefelwasserstoff, dampfte das Filtrat ein und fällte schließlich mit dem mehrfachen Volumen absoluten Alkohols.

Die erhaltene Paranucleïnsäure zeigte, wie nach der oben erwähnten Beobachtung Alexanders zu erwarten war, Biuretreaktion und war durch Ammonsulfat fällbar, wäre somit dem gewöhnlichen Sprachgebrauch nach den Albumosen zuzuzählen. Da sie aber keine Reaktion nach Adamkiewicz gab, ist anzunehmen, daß es sich um ein bereits vom Caseïn weiter abstehendes Abbauprodukt handelte. Die Zusammensetzung ergab sich nach dem Trocknen bei 110 bis 115° im Mittel zu: C 42,73 Proz., H 7,03 Proz., N 13,40 Proz., P 4,18 Proz.

Der in der Verbindung enthaltene Phosphor konnte sehr leicht abgespalten werden. Es genügte, die 1 proz. Lösung mit dem gleichen Volumen kalt gesättigten Barytwassers zum Sieden zu erhitzen, um die Ausscheidung eines phosphorhaltigen Niederschlages zu erhalten. Durch halbstündiges Erhitzen mit Natronlauge von 1,34 D. auf dem Wasserbade wurde Orthophosphorsäure abgespalten.

2. Darstellung der Uranylverbindung der Polypeptid-phosphorsäure.

Die von Salkowski benutzte Methode zur Darstellung der Paranucleïnsäure läßt die Möglichkeit offen, daß das erhaltene Produkt noch Albumosen beigemengt enthält. Wenigstens führt die Bildung eines Eisenniederschlages in einer Eiweißalbumosenlösung, nach im hiesigen Laboratorium gemachten Erfahrungen namentlich beim Erhitzen, sehr leicht zu einer Mitausfällung von Albumosen, deren nachträgliche Abtrennung auf Schwierigkeiten stößt. In der Tat gelang es, bei Anwendung eines anderen Fällungsmittels, des Uranylacetats, und entsprechender Reinigung durch Umfällung zu Produkten mit erheblich höherem Phosphorgehalt zu gelangen.

1. Versuchsanordnung. Bezüglich der Versuchsanordnung kann ich mich kurz fassen, da ich im Ansetzen des Verdauungsversuches im großen und ganzen den Angaben Salkowskis gefolgt bin, mit der Ausnahme, daß ich ein anderes Pepsin angewandt habe.

Ich gebrauchte ausschließlich das Pepsinum anglicum von Parke, Davis u. Co. Das Präparat ist entweder in Pulverform oder in kleinen Lamellen käuflich, in Wasser löslich und milchzuckerfrei.

30 g Caseïnum technicum wurden mit 1 Liter 0,2 proz. Salzsäure, in der vorher 2,5 g Pepsin gelöst waren, mehrere Stunden in der Schüttelmaschine geschüttelt. Das aus dieser Emulsion durch Filtration ganz klar gewonnene Filtrat wurde mit 0,2 proz. Salzsäure auf 2 Liter aufgefüllt und bei 40° der Verdauung überlassen. Nach zwei Tagen wurde die Verdauung abgebrochen. Die Lösung war ganz klar und nur schwach gelb gefärbt. Wie bereits erwähnt, habe ich bei meinen Verdauungsversuchen nie auch nur eine Trübung von Paranucleïn zu sehen bekommen. In mehreren Versuchen ließ ich drei Wochen verdauen, in wenigen einige Monate; auch da trat niemals Trübung oder gar Bildung eines Niederschlages ein.

2. Das Auftreten der Orthophosphorsäure. Nie fand sich nach zwei- bis dreitägiger Verdauung Phosphorsäure.

Wie schon Salkowski bemerkt, ist es manchmal recht schwierig, sicheres über An- oder Abwesenheit von abgespaltener Phosphorsäure in der Verdauungslösung auszusagen.

Mit Ammonmolybdatlösung erhält man regelmäßig in der mit Salpetersäure angesäuerten Flüssigkeit eine gelbgrüne Trübung, die sich bei längerem Stehen und beim Kochen zu einem Niederschlag verdichtet, der aber in keiner Weise dem Ammonmolybdänphosphat gleicht.

Mit Ammoniak und Baryumchlorid bleibt die Probe meist klar. Eine geringe Trübung, die aber selbst bei stundenlangem Stehen nicht zur Bildung eines Niederschlages führte, sah ich nicht für beweisend an. In einem einzigen Versuch mit lange dauernder (dreiwöchentlicher Verdauung war die

entstandene Trübung nicht eindeutig, so daß ich die gesamte Flüssigkeit vor weiterer Verarbeitung mit ammonikalischer Chlorbaryumlösung ausfällte, um etwa abgespaltene Phosphorsäure zu entfernen.

Übrigens ist durch Untersuchungen von Plimmer und Bayliss[1]) nachgewiesen, daß die Abspaltung der Phosphorsäure aus dem Caseïn durch Pepsinsalzsäure äußerst langsam erfolgt. Selbst nach 149 tägiger Verdauung war nur eine minimale Menge von freier Phosphorsäure nachweisbar.

3. Darstellung und Reinigung der Uranverbindung. Nachdem die Verdauungslösung 48 Stunden bei 40° im Brutofen gestanden hatte, wurde sie neutralisiert und auf etwa die Hälfte eingedampft. Von dem entstandenen geringen flockigen Niederschlage wurde abfiltriert, das Filtrat auf freie Phosphorsäure untersucht. Gewöhnlich fiel, wie erwähnt, die Phosphorreaktion negativ aus, und die Lösung konnte gleich weiter verarbeitet werden. Die neutrale Lösung wurde mit Essigsäure stark angesäuert und mit einer konzentrierten Lösung von Uranylacetat so lange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Wenn der Niederschlag sich gut abgesetzt hatte, wurde abfiltriert. Das Filtrat gab in wiederholten Fällen, wo darauf untersucht wurde, nach Eindampfen zur Trockne und Schmelzen mit Soda-Salpetermischung keine Spur von Reaktion mit Ammonmolybdatlösung, während der ebenso behandelte Niederschlag starke Phosphorreaktion gab. Es war somit der gesamte Phosphor in den Uranniederschlag übergegangen. Zur Reinigung wurde der weiße gelatinöse Niederschlag in verdünnter Salzsäure (10 proz.) aufgelöst, die Flüssigkeit filtriert, mit Uranylacetatlösung versetzt und mit Natronlauge bis zur beginnenden Trübung abgestumpft. Nun wurde konzentrierte Natriumacetatlösung zugegeben, bis nichts mehr ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltriert, wieder in 10 proz. Salzsäure gelöst und die Prozedur so oft wiederholt, bis das Filtrat nach dem Natriumacetatzusatz keine Biuretreaktion mehr gab.

Es darf dabei der Zusatz von etwas Uranylacetatlösung zu der salzsauren Lösung des Uranniederschlages vor dem Abstumpfen mit Natronlauge und Natriumacetatlösung nicht vergessen werden, da sonst von dem Uranniederschlag, der selbst die Biuretreaktion gibt, etwas in Lösung bleibt und so selbst Biuretreaktion im Filtrat bedingen kann. Bei kleineren Mengen genügt ein dreimaliges Umfällen, bei größeren kommt man damit nicht aus. Es empfiehlt sich, den zuletzt gewonnenen Niederschlag, dessen Filtrat biuretfrei ist, mit einer Nutsche auf einem gehärteten Filter abzusaugen, damit man die anhaftenden letzten Reste von Uranylacetat und Natriumacetat durch Auswaschen entfernen kann. Das Waschwasser prüft man auf die Anwesenheit von Uran am besten mit Salzsäure und Ferrocyan-

[1]) Journal of Physiology 33, 439 (1905—1906).

kalium. Der sorgfältig ausgewaschene Niederschlag wird auf Tonplatten gestrichen. Die trockenen braunen Brocken geben fein pulverisiert ein leicht gelb gefärbtes Pulver.

4. Einfluß der Verdauungsdauer. Um zu sehen, ob die Dauer der Verdauung auf die Zusammensetzung der Uranverbindung Einfluß hat, wurde der Urankörper aus der Verdauungslösung in einem Versuche erst nach achttägiger, in einem weiteren erst nach dreiwöchentlicher Verdauungszeit dargestellt. In letzterem Falle gab die neutral eingedampfte und vom auskoagulierten Eiweiß befreite Lösung mit Ammoniak und Baryumchlorid eine nicht eindeutige Trübung. Um daher ganz sicher zu gehen, versetzte ich sie mit Ammoniak und Baryumchlorid, filtrierte nach einigen Stunden von dem entstandenen Niederschlag ab und fällte in der nun keine freie Phosphorsäure mehr enthaltenden Lösung in der üblichen Weise mit Uranylacetat. Das so gewonnene Produkt zeigte in seinem Phosphor- und Stickstoffgehalt keine Abweichung von dem bei achttägiger und dem bei zweitägiger Verdauung erhaltenen.

3. Eigenschaften und Zusammensetzung der Uranylverbindung.

Die Uranverbindung ist in Salzsäure leicht löslich. Die Lösung gibt schöne Biuretreaktion. Phosphorwolframsäure erzeugt darin starken Niederschlag. Die Millonsche und Xanthoproteïnreaktion sind positiv. Molischs Probe und Tryptophanreaktion sind negativ. Die Substanz ist schwefelfrei. Kocht man mit Barytwasser eine halbe Stunde lang, so entsteht ein voluminöser flockiger Niederschlag, der den gesamten Phosphor enthält. Das Filtrat ist phosphor- und biuretfrei, aber fällbar durch Phosphorwolframsäure.

Die Phosphorbestimmungen wurden nach Neumanns[1]) alkalimetrischer Methode ausgeführt. Die Methode hat sich mir bei den zahlreichen Bestimmungen vorzüglich bewährt. Nur das Dekantieren des Ammoniumphosphormolybdats fand ich unbequem und zeitraubend und habe es, angeregt durch eine Angabe von Plimmer und Bayliss[2]), auf einfache Weise umgangen.

Gewöhnlich verfuhr ich so, daß ich zu der in einem Rundkolben mit langem Halse befindlichen Substanz etwa 8 ccm des Säuregemisches hinzufügte und nun auf einem Baboblech zuerst mit kleiner, dann mit stärkerer Flamme erhitzte. Ein weiteres Zutröpfelnlassen von Säuregemisch war nie

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 115.
[2]) A. a. O.

nötig. In fünf bis zehn Minuten war die Veraschung zu Ende und der Rückstand beim Erkalten wasserhell oder von Uran schwach gelb gefärbt. Die Weiterbehandlung geschah nach Neumann, nur mit dem Unterschied, daß ich den Molybdansäureniederschlag auf einen gewöhnlichen Goochtiegel mit Tonsiebchen und einer sorgfältig mit Säure und Alkali behandelten, dann mit Wasser bis zur neutralen Reaktion ausgewaschenen Asbestlage sammelte und an der Saugpumpe auswusch. In fünf Minuten war das Waschwasser neutral, so daß bei der Kürze der Einwirkung zum Auswaschen Wasser von Zimmertemperatur benutzt werden konnte. Nun wurde der Tiegel abgenommen und Niederschlag samt Asbest und Tonsieb durch Blasen von außen durch den durchsiebten Boden in den schon gebrauchten Rundkolben hineingeblasen. Um dies zu ermöglichen, war es zweckmäßig, von vornherein einen Rundkolben mit so weitem Hals zu wählen, daß der Tiegel mit seiner oberen breiteren Hälfte hineinpaßte. Die dem Tiegel noch anhaftenden letzten Reste des Niederschlages wurden mit n-NaOH in den Kolben nachgespült. Ich setzte zu diesem Zwecke dem Kolben einen Trichter auf, setzte den Tigel in den Trichter hinein und ließ durch Tiegel und Trichter langsam aus einer Bürette n-NaOH (Neumann empfiehlt $^1/_2$ n-NaOH) in den Kolben laufen, bis alles im Tiegel gelöst war. Nun wurde mit Wasser ordentlich nachgespült, Trichter mit Tiegel entfernt und direkt in den Kolben noch so viel n-NaOH aus der Bürette gegeben, bis auch im Kolben der ganze gelbe Niederschlag gelöst war; dazu kam dann noch der übliche Überschuß von n-NaOH. Asbest und Tonsieb bleiben im Kolben bis zum Schlusse der Bestimmung, sie stören weder das Kochen, noch die Titration. Auf diese Weise konnte ich zwei Bestimmungen in etwa einer Stunde ausführen.

Überdies wurde stets der Glührückstand bestimmt, und zwar in der Art, daß die Substanz, um Reduktion zu vermeiden, wiederholt mit Salpetersäure befeuchtet wurde. Es war zu erwarten, daß der Niederschlag wesentlich aus Uranylpyrophosphat bestehen würde. Wie sich herausstellte, enthielt der Niederschlag konstant Phosphor und Uran in äquimolekularem Verhältnis.

In zwei besonderen Versuchen wurde der Glührückstand gewogen, dann in Salpetersäure gelöst und das Uran nun nach Zusatz von Natriumphosphat aus essigsaurer, mit Natriumacetat versetzter Lösung gefällt, ausgewaschen und geglüht. Wäre nicht an Phosphorsäure gebundenes Uran vorhanden gewesen, so hätte durch weitere Bildung von Uranylpyrophosphat eine Gewichtsvermehrung eintreten müssen. Das war aber nicht der Fall.

0,348 g Substanz lieferten beim Glühen 0,1720 g Rückstand; dieser gab, in obiger Weise behandelt, beim zweiten Glühen 0,1710 g Uranylpyrophosphat.

0,3000 g Substanz gaben beim ersten Glühen 0,1490 g, nach Vornahme obiger Behandlung beim zweiten Glühen 0,1488 g Rückstand.

0,2216 g Substanz gaben, ebenso behandelt, beim ersten Glühen 0,1090, beim zweiten 0,1095 g Rückstand.

Der Glührückstand besteht sonach aus Uranylpyrophosphat, und sein Gewicht kann daher gleichzeitig zur Berechnung des Phosphors und Urans dienen, wie dies in unten folgender Tabelle durchgeführt ist.

Die C- und H-Bestimmungen wurden durch Verbrennen mit Bleichromat, die N-Bestimmungen teils nach Dumas, teils nach Kjeldahl ausgeführt.

Die nachfolgend mitgeteilten Analysen beziehen sich auf bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz. Es kamen zahlreiche Präparate verschiedener Darstellung zur Analyse.

1. 0,2016 g gaben 0,1764 g CO_2 = 23,84 Proz. C und 0,0752 g H_2O = 4,17 Proz. H.
2. 0,2019 „ „ 0,1773 „ „ = 23,95 „ „ „ 0,0751 „ „ = 4,16 „ „
3. 0,1621 „ „ 0,1442 „ „ = 24,26 „ „ „ 0,0527 „ „ = 3,65 „ „
4. 0,2003 „ „ 12,87 ccm N bei 19,3° C und 766,1 mm B = 7,45 „ N (Dumas).
5. 0,8258 „ erforderten 44,8 ccm $^1/_{10}$ n-H_2SO_4 = 7,59 Proz. N (Kjeldahl).
6. 0,3474 „ „ 19,16 „ „ = 7,70 „ „ „
7. 0,1386 „ „ 7,48 „ „ = 7,61 „ „ „
8. 0,3290 „ „ 13,3 „ $^1/_1$ n-H_2SO_4 = 4,47 „ P
9. 0,2855 „ „ 11,6 „ „ = 4,50 „ „
10. 0,1843 „ „ 6,7 „ „ = 4,02 „ „
11. 0,1393 „ „ 5,2 „ „ = 4,13 „ „
12. 0,1619 „ „ 6,0 „ „ = 4,10 „ „
13. 0,2287 „ „ 9,3 „ „ = 4,50 „ „
14. 0,2312 „ „ 9,1 „ „ = 4,36 „ „
15. 0,2618 „ „ 9,6 „ „ = 4,06 „ „
16. 0,3160 „ „ 11,8 „ „ = 4,13 „ „
17. 0,1395 „ „ 5,2 „ „ = 4,13 „ „
18. 0,2042 g gaben beim Glühen 0,1002 g Rückstand $P_2O_7(UO_2)_2$ = 4,24 Proz. P und 32,79 Proz. U.
19. 0,2489 g gaben beim Glühen 0,1236 g Rückstand $P_2O_7(UO_2)_2$ = 4,29 Proz. P und 33,18 Proz. U.
20. 0,2360 g gaben beim Glühen 0,1133 g Rückstand $P_2O_7(UO_2)_2$ = 4,15 Proz. P und 32,08 Proz. U.
21. 0,1830 g gaben beim Glühen 0,0930 g Rückstand $P_2O_7(UO_2)_2$ = 4,39 Proz. P und 33,96 Proz. U.
22. 0,2661 g gaben beim Glühen 0,1377 g Rückstand $P_2O_7(UO_2)_2$ = 4,47 Proz. P und 34,58 Proz. U.
23. 0,2659 g gaben beim Glühen 0,1371 g Rückstand $P_2O_7(UO_2)_2$ = 4,47 Proz. P und 34,53 Proz. U.
24. 0,2216 g gaben beim Glühen 0,1090 g Rückstand $P_2O_7(UO_2)_2$ = 4,25 Proz. P und 32,87 Proz. U.
25. 0,3480 g gaben beim Glühen 0,1710 g Rückstand $P_2O_7(UO_2)_2$ = 4,25 Proz. P und 32,84 Proz. U.
26. 0,3000 g gaben beim Glühen 0,1488 g Rückstand $P_2O_7(UO_2)_2$ = 4,29 Proz. P und 33,16 Proz. U.

Zusammenstellung.

C	H	N	P		U
			bestimmt nach Neumann	bestimmt aus d. Glührückstande	
Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
23,84	4,17	7,45	4,47	4,24	32,79
23,95	4,16	7,59	4,50	4,29	33,18
24,26	3,65	7,70	4,02	4,15	32,08
—	—	7,61	4,13	4,39	33,96
—	—	—	4,10	4,47	34,58
—	—	—	4,50	4,47	34,53
—	—	—	4,36	4,25	32,87
—	—	—	4,06	4,25	32,84
—	—	—	4,13	4,29	33,16
—	—	—	4,13	—	—
Mittel: 24,02	4,00	7,59	4,24	4,31	33,33

Im Mittel ergibt sich demnach folgende Zusammensetzung: C 24,02 Proz., H 4,00 Proz., N 7,59 Proz., P 4,27 Proz., U 33,33 Proz., O 26,81 Proz.

Aus den vorstehenden Analysenzahlen geht hervor, daß die auf beschriebene Weise dargestellten Uranylpräparate sehr annähernd konstante Zusammensetzung aufweisen. Das Verhältnis der Phosphoratome zur Zahl der Uranatome ergibt sich bei Berechnung als 1:1,009, d. h. P und U sind in äquimolekularer Menge vorhanden. Die Zusammensetzung der Verbindung ist dem Uranylammoniumphosphat $(UO_2)(NH_4)PO_4$ zu vergleichen; nur ist das Ammonium durch einen Albumosenkomplex, der überdies wohl esterartig, nicht salzartig gebunden ist, ersetzt. So erscheint auch die Bildung von Uranylpyrophosphat beim Glühen ohne weiteres verständlich.

Danach könnte es scheinen, daß eine relativ einfache Verbindung, eine gepaarte Orthophosphorsäure vorliegt. Die weitere Untersuchung zeigte aber, daß die Verhältnisse leider nicht so einfach liegen. Schon der Versuch einer Formelberechnung führt zu einer Bruttoformel, die mindestens zwei Phosphoratome enthält. Ich führe sie umstehend an, ohne ihr einen anderen als orientierenden Wert beizumessen.

Noch deutlicher ergab sich aus der Hydrolyse, daß die vorliegende Verbindung einen unerwartet komplizierten Bau hat.

	Berechnet für $C_{29}H_{56}N_8P_2U_2O_{24}$	Gefunden
C	24,14 Proz.	24,04 Proz.
H	3,91 „	4,00 „
N	7,78 „	7,59 „
P	4,30 „	4,27 „
U	33,25 „	33,33 „
O	26,62 „	26,81 „

4. Hydrolyse der Uranylverbindung.

Zunächst wurde behufs Orientierung die Verteilung des Stickstoffs nach bekanntem Verfahren ermittelt. Es wurde auf 100 N erhalten: 23,8 Amid-N, 18,7 Diamino-N, 56,7 Monamino-N, ein Resultat, das wegen der hohen Amidzahl, die ungefähr einem Viertel des Gesamtstickstoffs entspricht, bemerkenswert ist.

Behufs Gewinnung des Materials für eine Hydrolyse in größerem Umfange wurden etwa 400 g der Uranylverbindung dargestellt.

3 kg Caseïn technic. werden in der oben beschriebenen Weise mit 200 Liter Pepsinsalzsäure acht bis zehn Tage lang bei 37 bis 40° verdaut. Nach dieser Zeit wird die Verdauungslösung neutralisiert, mit wenig Essigsäure angesäuert und auf die Hälfte eingedampft. Nach Abfiltrieren von dem koagulierten Eiweiß wird mit Uranylacetat gefällt, der voluminöse Niederschlag zur Reinigung in Salzsäure gelöst und mit Natronlauge und Natriumacetat wieder ausgefällt. Nachdem diese Prozedur noch fünfmal wiederholt worden ist, gibt das letzte Filtrat des Uranniederschlages keine Biuretreaktion mehr.

Es werden so 430 g trockener Substanz gewonnen. Davon werden 380 g in 2 Liter 25 proz. Schwefelsäure aufgelöst und in zwei Kolben sechs Stunden lang gekocht. Die Zersetzungsflüssigkeit ist dunkel gefärbt und scheidet beim Verdünnen schwarze Flocken ab. Diese werden abfiltriert und getrocknet. Sie wiegen 1,6 g mit einem Stickstoffgehalt von 0,051 g. Die Zersetzungsflüssigkeit gibt schwache Millonsche Reaktion, keine Reaktion nach Molisch, keine Biuretprobe, keine Fällung mit Jodquecksilberkalium, starke Fällung mit Phosphorwolframsäure. Von der Erwägung ausgehend, daß das Ausgangsmaterial von 380 g Uranniederschlag etwa 50 Proz., im ganzen somit etwa 200 g organische Substanz enthält, wurden, um die Mitausfällung der Diaminotrioxydodekansäure zu vermeiden, die 2 Liter Zersetzungsflüssigkeit auf 20 Liter aufgefüllt. So wurde eine Flüssigkeit mit dem Gehalt von etwa 1 Proz. organischer Substanz und $2^1/_2$ Proz. H_2SO_4 erhalten, welche nun zum Ausfällen der Diaminosäuren mit Phosphorwolframsäure versetzt wurde.

Der voluminöse Phosphorwolframsäureniederschlag wird noch zweimal in schwefelsäurehaltigem Wasser suspendiert, scharf ab-

gesaugt und dann aus viel siedendem Wasser umkristallisiert. Beim Erkalten fallen schöne Nadeln aus. Die Kristalle werden abgesaugt, getrocknet und gewogen: 170 g. Der Gehalt an C betrug 3,8 Proz., der an N 2,3 Proz. Das Verhältnis von C : N war 1,8 : 1, also nahe 2 : 1. Gesamtstickstoff des Niederschlages gleich 3,91 g.

Ein nicht unbeträchtlicher Teil des Niederschlages blieb beim Behandeln mit siedendem Wasser ungelöst. Vermutlich lag Ammoniumphosphorwolframat vor.

Der 170 g wiegende kristallinische Phosphorwolframsäureniederschlag wird in siedendem Wasser gelöst und mit gepulvertem Baryt zerlegt. Nach vollendeter Umsetzung wird der Niederschlag abgesaugt, das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt und aufgekocht. Das Filtrat vom Baryumkarbonat wird auf ein kleines Volumen eingedampft, es reagiert alkalisch und enthält noch etwas Baryum, das durch Zusatz von 40 ccm 5 proz. H_2SO_4 vollständig ausgefällt wird.

a) Histidin.

Das Filtrat, das den erforderlichen Gehalt von $2^1/_2$ Proz. H_2SO_4 enthielt, wurde nach Kossel und Patten mit Mercurisulfat ausgefällt. Nach 24 Stunden wird der Niederschlag abgesaugt, nochmals in verdünnter Schwefelsäure suspendiert und wieder abgesaugt. Die vereinigten Filtrate = b werden auf Arginin und Lysin verarbeitet. Der Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Quecksilbersulfid durch Luftdurchleiten von Schwefelwasserstoff und durch Zusatz von Barytwasser von Schwefelsäure befreit, das überschüssige Baryum zum größten Teil als Karbonat, der letzte Rest mit Schwefelsäure quantitativ entfernt. Das restierende alkalische Filtrat wird mit konzentrierter Salzsäure auf ein kleines Volumen eingedampft. Nach mehrtägigem Stehen im Exsikkator über Schwefelsäure erfolgte reichliche Kristallisation von Histidindichlorid. Die Ausbeute betrug 0,6 g. Der Schmelzpunkt betrug 230°. Kutscher gibt den Schmelzpunkt des Histidindichlorids zu 231 bis 233° an. Die Kristalle sowie die Mutterlauge gaben deutliche Imidazolreaktion (Pauli[1]). Zur Reinigung wurden die Kristalle nach Kossel zweimal in wenig heißer konzentrierter Salzsäure gelöst und mit Alkoholäther gefällt, abgesaugt und mit Äther gewaschen.

0,1574 g gaben 0,2011 g AgCl.

	Berechnet für $C_6H_9N_3O_2 . 2HCl$	Gefunden
C	31,10 Proz.	31,59 Proz.

b) Arginin.

Das Filtrat vom Histidinquecksilber wird nach Kossel mit gepulvertem Silbersulfat so lange behandelt, bis eine Probe mit Barytwasser Gelbfärbung gibt. Nun wird mit Barytwasser übersättigt und nach 24 Stunden abgesaugt. Der Niederschlag wird abermals mit gepulvertem Baryt zerrieben. Der Silberniederschlag liefert nach Entfernung von Silber und Schwefelsäure und weiterer Reinigung schließlich ein alkalisches Filtrat, das nach dem Ein-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 508.

dampfen auf ein kleines Volumen mit Salpetersäure neutralisiert und mit alkoholischer Silbernitratlösung versetzt wird. Von dem zuerst ausfallenden amorphen Niederschlag wird abgegossen, mit absolutem Alkohol und vorsichtig mit Äther versetzt und geschüttelt. Es fallen schöne Kristalle aus, deren Menge nach weiterem Schütteln mit Äther zunimmt. Es gelang schließlich, 0,4 g zu gewinnen. Nach wiederholtem Umkristallisieren reichte die übrig bleibende Menge nicht mehr zu einer Analyse. Die Substanz schmolz bei 166°, nach weiterem Umkristallisieren zersetzte sie sich bei 172°. Gulewitsch gibt als Schmelzpunkt 176 bis 183° an. Trotz dieser Differenz ist auf Grund der Darstellung und der Eigenschaften an der Identität der Kristalle mit Argininsilbernitrat nicht zu zweifeln.

c) Lysin.

Das Filtrat vom Argininsilber enthielt Baryum und Silber, die durch Kohlensäure und Schwefelwasserstoff entfernt wurden. Das hellgelbe Filtrat wurde zur Trockne eingedampft, mit wenig Wasser aufgenommen und nochmals eingedampft, wobei es zum Kristallbrei erstarrte. Nachdem die Kristalle in wenig Wasser wieder in Lösung gebracht waren, wurde mit alkoholischer Pikrinsäurelösung gefällt. Unter Kohlensäureentwickelung fiel ein gelber, körniger Niederschlag aus. Ausbeute = 18 g. Nach Umkristallisieren aus wenig siedendem Wasser fielen sofort prachtvolle gelbe Nadeln aus, die sich nach zweimaligem Umkristallisieren als Lysinpikrat erwiesen.

0,2481 g Substanz gaben 39,59 ccm N bei 15,1° C und 751,0 mm B.

	Berechnet für $C_6H_{14}N_2N_2 . C_6H_2(NO_2)_3OH$	Gefunden
N	18,69 Proz.	18,47 Proz.

d) Aminosäuren.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde nun mit Barytwasser völlig ausgefällt, wodurch Phosphorwolframsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure und Uran entfernt wurden. Das Filtrat wurde durch Einleiten von Kohlensäure, Aufkochen und Filtrieren vom Barytüberschuß befreit, auf ein kleines Volumen eingedampft und nach Entfernen des nachträglich ausgefallenen Baryumkarbonats mit Alkohol gefällt:

Alkoholniederschlag = B_1, alkoholische Lösung = B_2.

B_1. Der Alkoholniederschlag wurde in Wasser aufgelöst, mit Schwefelsäure vom Baryum quantitativ befreit, verdünnt und mit Kupferkarbonat gekocht. Das blaue Filtrat wurde eingedampft und zur Kristallisation gebracht. Es schieden sich zweierlei Kupfersalze aus, die tyrosinähnlichen blauen Nadelbüschel des Kupferasparagats und Wetzsteinformen des glutaminsauren Kupfers. Da eine scharfe Trennung der beiden Kupfersalze sich durch Umkristallisieren nicht erreichen ließ, wurde alles in Salzsäure gelöst, Schwefelwasserstoff eingeleitet, das Filtrat von Schwefelkupfer auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Salzsäuregas gesättigt. Es erfolgte reichliche Kristallisation von Glutaminsäurechlorhydrat. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, die mit den bei 110° getrockneten schneeweißen Kristallen vorgenommen wurde, ergab folgendes:

0,1685 g verbrauchten 8,95 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH = 7,39 Proz. N.
0,1215 g „ 6,38 „ „ = 7,31 „ „

Berechnet für $C_5H_9NO_4ClH$		Gefunden
N	7,64	7,39 Proz.
		7,31 „

Die Kristalle waren rechtsdrehend. Die Ausbeute betrug 20 g.

Das viel Salzsäure enthaltende Filtrat vom Glutaminsäurechlorhydrat wurde wiederholt behufs Vertreibens der Salzsäure eingedampft, schließlich wurde so lange mit Kupferoxydul gekocht, bis in der Flüssigkeit nur mehr wenig Chlor nachweisbar war. Von dem unlöslichen Kupferchlorür wurde abfiltriert und die blaue Lösung mit Kupferkarbonat gekocht, wobei sie nur wenig Kupfer mehr aufnahm. Das Filtrat wurde auf ein kleines Volumen eingedampft. Nach längerem Stehen fiel asparaginsaures Kupfer in typischen Formen aus.

0,2071 g lufttrockenes Kupfersalz gaben beim Glühen 0,0604 g CuO.

Berechnet für $CuC_4H_5NO_4 + 4^1/_2 H_2O$		Gefunden
Cu	23,06 Proz.	23,30 Proz.

Die Ausbeute betrug nur 1,5 g, doch war die vorhergehende Behandlung sicher mit großen Verlusten verbunden.

B_2. Aus der alkoholischen Lösung wurde der Alkohol abdestilliert. Beim Eindampfen schieden sich neben leucinähnlichen Kugeln tyrosinähnliche Nadelbüschel aus, die einen Schmelz- und Zersetzungspunkt von 265° zeigten und sehr schwach Millonsche Reaktion gaben. Alles wurde in viel Wasser gelöst, wobei ein sehr geringer Rest (Tyrosin?) zurückblieb, der nicht weiter untersucht wurde. Nach Entfernung des Baryums mittels Schwefelsäure wurde behufs Nachweis von Diaminotrioxydodekansäure nochmals mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der geringe Niederschlag wurde umkristallisiert, wobei ein Teil ungelöst zurückblieb. Die ausgefallenen Kristalle hatten Kugelformen, sie wurden der allzu geringen Menge wegen nicht weiter verarbeitet. Das Filtrat wurde mit Barytwasser von Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure befreit, das überschüssige Baryum durch CO_2 entfernt, die Lösung zur Trockne eingedampft und auf Prolin verarbeitet. Es gelang indessen nicht, bei Anwendung der Methode von Kossel und Dakin[1]) durch Extraktion mit absolutem Alkohol genügend Substanz zu isolieren, um Prolin zu identifizieren.

Der in absolutem Alkohol unlösliche Teil des Trockenrückstandes wurde nach Fischer verestert, er wog 40 g. Beim Sättigen mit ClH fielen noch 20 g $BaCl_2$ aus, entsprechend 13,13 g Ba, so daß also etwa 27 g organische Substanz verestert wurden. Bei der Destillation der Ester erhielt ich drei Fraktionen.

	Druck	Temperatur	
	mm	innen	des Bades
Fraktion I	5—2	24—60°	75°
Fraktion II	2	60—82°	100°
Fraktion III	2	110—152°	110—200°

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 410.

Die zweite Fraktion wurde nochmals bei 2 mm Druck und 40° Wasserbadtemperatur destilliert, wobei aber nichts überging. Die drei Fraktionen wurden nun in der von Fischer angegebenen Weise weiter verarbeitet.

Fraktion I und II.

Aus Fraktion I wurden nach Verseifen mit Wasser durch fraktionierte Kristallisation drei Fraktionen gewonnen: A, B und C. Fraktion II erstarrte beim Eindampfen zum Kristallbrei und wurde zur Trockne gebracht = D. B, C und D wurden mit absolutem Alkohol ausgekocht, wobei jede Fraktion in einen alkoholischen Rückstand B_1, C_1 und D_1 und eine alkoholische Lösung B_2, C_2 und D_2 getrennt wurde.

a) Alle in absolutem Alkohol unlöslichen Teile der Fraktion I und II, also A, B_1, C_1 und D_1 wurden in Wasser gelöst und mit Kupferkarbonat gekocht. Beim Erkalten des Filtrats fiel ein blaßblaues Kupfersalz aus. Durch wiederholtes Eindampfen und Kristallisieren gelang es, eine scharfe Trennung in ein in Wasser fast unlösliches und in ein wasserlösliches Kupfersalz zu erzielen. Die Ausbeute an unlöslichem Kupfersalz betrug 1,6 g. Es handelte sich der Hauptmasse nach um Leucinkupfer. Die lufttrockene Substanz verlor bei 100° nicht an Gewicht.

0,2061 g gaben beim Glühen 0,0488 g CuO.

	Berechnet für $Cu(C_6H_{12}NO_2)_2$	Gefunden
Cu	19,63 Proz.	18,92 Proz.

b) Die in Wasser leicht löslichen Kupfersalze der Aminosäuren von Fraktion I und II stellten eine schöne blaue Lösung dar, aus der beim Eindampfen prachtvolle Kristalldrusen, bestehend aus unregelmäßigen Platten, erhalten wurden. Die Ausbeute betrug 3,74 g. Das schöne blaue Kupfersalz enthielt etwa 5 Proz. Kristallwasser und 19 Proz. Kupfer.

Die Eigenschaften der Verbindung, sowie ihre Zusammensetzung erinnerten an die von E. Fischer[1]) beobachteten Mischkristalle von Leucinkupfer und aminovaleriansaurem Kupfer. Aber erst unter Zuhilfenahme der Angaben F. Ehrlichs[2]) über das Isoleucin gelang es, die Substanz so weit zu reinigen, daß die Analysenzahlen mit den Fischerschen übereinstimmten. Ehrlichs Beschreibung des Isoleucinkupfers stimmt fast genau zu dem Verhalten meines Kupfersalzes; nur der Kristallwassergehalt hielt mich von der Annahme zurück, daß ich es einfach mit Isoleucinkupfer zu tun hatte. Das Salz benetzte sich mit Wasser schwer, war aber beim Schütteln in Wasser gut löslich, löste sich leicht und mit dunkelblauer Farbe in Methylalkohol und zum großen Teil auch in Benzylalkohol. Beim Auflösen von 3,2 g in Methylalkohol blieben nur 0,2 g eines blaßblauen Kupfersalzes ungelöst (siehe unter c). Nach Abdestillieren des Methylalkohols kristallisierte wieder das Kupfersalz aus. Die Kristallmenge nahm zu, als ich dem Destillationsrückstand Wasser zusetzte. Die Kristalle erwiesen sich mikroskopisch als schöne dreiseitige Platten mit zwei abgestumpften Ecken. Es wurde alles in wenig heißem Wasser gelöst und filtriert. Beim Erkalten und Eindampfen kristallisierte das Salz wieder in unregelmäßigen Platten aus.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 162.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 1904, S. 1809.

I. 0,1912 g lufttrockene Substanz gaben beim Glühen 0,0448 g CuO.
II. 0,3244 „ „ „ verloren bei 110° 0,0173 „ H_2O.
III. 0,4112 „ „ „ verloren bei 110° 0,0227 „ H_2O.
IV. 0,2220 „ wasserfreie „ gaben beim Glühen 0,0567 „ CuO.

	Berechnet für $C_{11}H_{22}N_2O_4Cu + H_2O$	Gefunden			
		I.	II.	III.	IV.
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
H_2O	5,50	—	5,33	5,52	—
Cu im lufttrockenen Salz . .	19,39	18,73	—	—	—
Cu im wasserfreien Salz . .	20,52	—	—	—	20,40

Es lag somit ohne Zweifel das von E. Fischer beschriebene Gemenge von Kupfersalzen der Aminovaleriansäure und einer Aminocapronsäure vor. Um die Natur der letzteren zu bestimmen, führte ich in einem Vergleichsversuch äquimolekulare Mengen von aktivem Leucin und Valin (aus Kürbiskeimlingen) in das Kupfersalz über, dampfte die blaue Lösung zur Trockne ein und behandelte mit Methylalkohol. Dabei ging fast nur das Valinkupfer in Lösung, während das Leucinkupfer als in Methylalkohol und kaltem Wasser unlösliches hellblaues Pulver zurückblieb. Das erhaltene Gemenge kann sonach nicht Leucinkupfer als wesentlichen Bestandteil enthalten. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um ein äquimolekulares Gemenge von Isoleucin und Valin, denn Valin- und Isoleucinkupfer zeigen, wie ich mit Schultze und Winterstein[1]) finde, im Gegensatz zu Leucin- und Alaninkupfer sehr große Löslichkeit in Methylalkohol, und daß die Anwesenheit des Valinkupfers nicht die Löslichkeit des Leucinkupfers darin erheblich steigert, geht aus obiger Beobachtung hervor[2]).

c) Der in Methylalkohol unlösliche Teil im Gewicht von etwa 0,2 g ging beim Behandeln mit wenig siedendem Wasser größtenteils in Lösung; ein unbedeutender Teil (vermutlich Leucinkupfer) blieb als schwer lösliches Pulver zurück. Die Ausbeute an dem leichter löslichen Kupfersalz betrug nach dem Umkristallisieren 0,1637 g. Das Salz verlor bei 110° noch 3,97 Proz. Wasser.

0,1441 g der getrockneten Substanz gaben 0,0472 g CuO, was einem Kupfergehalt von 26,16 Proz. entspricht. Alaninkupfer $(C_3H_6NO_2)_2Cu$ verlangt 26,52 Proz. Cu.

d) Die vereinigten absolut-alkoholischen Auszüge aus Fraktion I und II wurden im Vakuum zur Trockne gebracht, der Rückstand gab, in Wasser gelöst und mit Kupferkarbonat gekocht, eine tiefblaue Lösung von eigentümlichem, jedesmal beim Eindampfen in charakteristischer Weise auftretendem Geruch. Beim Eindampfen kristallisierte wiederholt noch etwas Leucinkupfer aus, das beim Lösen in kaltem Wasser zurückblieb. Schließlich wurden 1,2 g eines wasserlöslichen Kupfersalzes erhalten, das die Fichtenspanreaktion gab und vakuumtrocken einen Kupfergehalt aufwies, der jenem des Prolinkupfers entspricht.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 60.

[2]) Auch F. Ehrlich (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 1907, S. 2538) weist in seiner zweiten Mitteilung über die Isomeren des Leucins auf die Mischkristalle von Isoleucin- und Valinkupfer hin.

0,2010 g gaben 0,0532 g CuO = 21,14 Proz. Cu.
0,1770 g gaben 0,0481 g CuO = 21,68 Proz. Cu.

Prolinkupfer $(C_5H_8NO_2)_2Cu$ verlangt 21,79 Proz.

Fraktion III.

Die Fraktion III wurde nach Lösen mit Wasser zunächst mit Äther extrahiert.

a) Nach Abdestillieren des Äthers wurde das Extrakt mit konzentrierter Salzsäure eingedampft und die gewonnene geringe Kristallmenge mit Ammoniak zur Trockne gebracht. Der Versuch, durch Auslaugen mit kaltem Wasser das Produkt vom Chlorammonium zu trennen, erwies sich wegen der geringen Menge als unausführbar. Hingegen gelang es, durch Kochen mit Kupferkarbonat 0,1120 g eines Kupfersalzes zu erhalten, das beim Oxydieren mit Bichromat und Schwefelsäure ausgesprochenen Geruch nach Phenylacetaldehyd entwickelte und einen für Phenylalaninkupfer sprechenden Kupfergehalt besaß.

0,1060 g bei 110° getrockneter Substanz gaben beim Glühen 0,0210 g CuO = 15,82 Proz. Cu.

$(C_9H_{10}NO_2)_2Cu$ verlangt 16,23 Proz. Cu.

b) Die nach der Ätherextraktion zurückbleibende wässerige Lösung wurde mit Barytwasser auf dem Wasserbade einige Stunden digeriert, dann mit Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit, eingeengt und das auf ein kleines Volum gebrachte Filtrat mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag, der noch Asparaginsäure und Glutaminsäure hätte enthalten können, wurde wegen allzu geringer Menge nicht verarbeitet. Die alkoholische barytfreie Lösung wurde durch Destillation von Alkohol befreit, der Rückstand in Wasser gelöst und mit Kupferkarbonat gekocht. Aus dem schön blauen Filtrat fiel beim Erkalten und Stehen ein tiefblaues Kupfersalz, freilich nur in sehr geringer Menge, aus. Es enthielt kein Kristallwasser.

0,0425 g gaben beim Glühen 0,0098 g CuO, was 18,42 Proz. Cu entspricht.

Da dieser Kupfergehalt jenem des Kupfersalzes der Diaminotrioxydodekansäure entspricht (E. Fischer findet 18,40 Proz. Cu), so könnte in diesem Befunde ein Hinweis auf die etwaige Gegenwart dieser Säure gesehen werden, auf die indes direkt vergebens gefahndet wurde.

c) Das in Lösung gebliebene Kupfersalz gab noch Phenylacetaldehydreaktion. Es konnten noch 0,13 g Kristalle eines Kupfersalzes erhalten werden, das lufttrocken etwa 17,5 Proz. Cu enthielt. Ein Salz vom Verhalten des Leucinkupfers wurde hier nicht erhalten.

Auf Purinbasen bin ich während der Verarbeitung der Uranylverbindung nirgends gestoßen.

Es wurden sonach bei der Hydrolyse erhalten: Glutaminsäure (13,4 g), Lysin (7,0 g), Isoleucin (1,5 g), Aminovaleriansäure (1,4 g), Leucin (1,3 g), Asparaginsäure (1,0 g), Prolin (0,9 g), Histidin (0,4 g), Arginin (0,2 g), Phenylalanin (0,1 g), Alanin (0,1 g), Tyrosin (Spuren).

Es braucht kaum hervorgehoben zu werden, daß die angegebenen Ausbeuten nur insofern einen Wert besitzen, als sie zeigen, daß

einzelne der im Caseïn enthaltenen Aminosäuren in der Uranylverbindung in überwiegender Menge vorhanden sind, andere fehlen oder doch sehr zurücktreten. Für eine quantitative Betrachtung müssen erst durch genauere Bestimmungen der einzelnen Spaltungsprodukte die nötigen Grundlagen gewonnen werden.

5. Zusammenfassende Bemerkungen.

Wie aus vorstehendem hervorgeht, läßt sich der phosphorhaltige Komplex des Caseïns aus der durch Pepsinverdauung erhaltenen Lösung mittels Uranylacetat in Form eines konstant zusammengesetzten Niederschlages ausfällen. Das Atomverhältnis darin stellt sich zu 14,5 C : 3,9 N : 1 P : 1 U. Aus Salkowskis Eisenverbindung der „Paranucleïnsäure“ berechnet sich dieses Verhältnis zu 32,3 C : 8,4 N : 1 P, aus seiner freien Paranucleïnsäure zu 26,4 C : 7,1 N : 1 P. Die von mir erhaltene Substanz ist somit erheblich phosphorreicher; sie enthält, uranylfrei berechnet, 6,9 Proz. P, während Salkowski in seiner Paranucleïnsäure höchstens 4,31 Proz. findet.

Da einerseits der Phosphor der Substanz leicht quantitativ abgespalten werden kann, andererseits der darin enthaltene organische Komplex durchaus die Eigenschaften und den Bau eines Polypeptids darbietet, darf man die vorliegende Substanz als eine Polypeptidphosphorsäure (bzw. als ein Gemenge solcher Säuren, siehe unten) bezeichnen.

Da diese Säure einen achtmal größeren Phosphorgehalt als das ursprüngliche Caseïn (0,83 Proz.) besitzt, muß sie, die gleiche Zahl P-Atome vorausgesetzt, ein mindestens achtmal kleineres Molekulargewicht besitzen. Danach könnte ein relativ niedriges Molekulargewicht erwartet werden. Auf Grund des Phosphorgehaltes würde es sich etwa zu 450 oder einem Multiplum davon berechnen.

Dieser einfachen Vorstellung widerspricht jedoch die große Zahl der bei der Hydrolyse erhaltenen Spaltungsprodukte. Selbst wenn man — nicht ohne Willkür — die nur in sehr geringer Menge erhaltenen Produkte (Phenylalanin, Alanin) und die nicht ausreichend identifizierten (Trioxydiaminododekansäure, Tyrosin) als dem Molekül nicht angehörige Beimengungen von der Berechnung ausschließt, bleiben als nicht zu vernachlässigende Spaltungsprodukte immer noch Lysin, Arginin, Histidin, Leucin, Isoleucin, Valin, Glutaminsäure, Prolin und Asparaginsäure, was selbst für den Fall, daß jede Aminosäure mit nur je einem Molekül vertreten wäre, zu einer Verbindung mit 49 Kohlenstoffen führt. Tatsächlich müßte aber das Mole-

kulargewicht noch viel höher veranschlagt werden, da das Lysin und die Glutaminsäure in vergleichsweise zu großer Menge vertreten sind, um bloß einem Molekül zu entsprechen. Dasselbe ergibt sich aus dem Vergleich des Diaminostickstoffs mit dem Gesamtstickstoff. Die gefundenen geringen Mengen Arginin und Histidin können, trotzdem sie dem Lysin gegenüber sehr zurücktreten, nicht einfach als Beimengungen angesehen werden, da die Bestimmung des umkristallisierten Phosphorwolframats das Verhältnis C : N = 1,8 : 1 ergeben hatte, im Lysin aber dieses Verhältnis = 3 : 1 ist, so daß die Annahme einer erheblichen Beimengung von Arginin (C : N = 1,5 : 1) oder Histidin (C : N = 2 : 1) oder von beiden nicht zu umgehen ist. Dann aber ergibt sich für die einfachste Annahme (1 Lysin + 1 Argin + 1 Histidin = 9 N), da die Menge des Diaminostickstoffs zu nahe 20 Proz. gefunden wurde, eine Mindestzahl von 45 N im Gesamtmolekül.

Es bleiben zur Erklärung dieser quantitativen Verhältnisse folgende Annahmen übrig: 1. Bei der Hydrolyse entstehen aus einzelnen Aminosäuregruppen des Polypeptids mehr als eine Aminosäure, so daß die Zahl der hydrolytischen Produkte größer ist als die der zugrunde liegenden Gruppen — eine Annahme, die allenfalls für Glutaminsäure und Prolin herangezogen werden könnte, im übrigen aber nichts für sich hat. 2. Das Molekül der Polypeptidphosphorsäure ist sehr groß, nicht viel kleiner und einfacher, als man es bisher für das Caseïn postuliert hat. 3. Es liegt trotz der Konstanz der Zusammensetzung des Uranylniederschlages darin nicht bloß eine Polypeptidphosphorsäure vor, sondern ein konstantes Gemenge von zwei oder mehr solchen Säuren, die im Bau alle dem Schema Polypeptid — $PO.(OH)_2$ entsprechen.

Welche von diesen Annahmen sich bei weiterer Untersuchung als die zutreffende erweisen dürfte, kann vorläufig unerörtert bleiben. Die Möglichkeit, auf dem eingeschlagenen Wege zu der reinen Polypeptidphosphorsäure des Caseïns, bzw. zu einem konstanten Gemenge solcher Säuren zu gelangen, weist den Weg zu weiterer erfolgreicher Untersuchung, und ich hoffe binnen kurzem selbst über Versuche einerseits nach dieser Richtung, sodann aber auch über die physiologische Verwertung der Polypeptidphosphorsäure im Tierkörper berichten zu können.

II.

Über das Verhalten des Glykosamins und seines nächsten Umwandlungsproduktes im Tierkörper.

Von Dr. K. Stolte,
Assistenten am physiologisch-chemischen Institut.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

1.

Bei dem häufigen Vorkommen des Glykosamins als Spaltungsprodukt von Eiweißkörpern ist es verständlich, daß schon eine ganze Reihe von Forschern sein Verhalten im Tierkörper zum Gegenstand der Untersuchung gemacht haben. Aus den vorliegenden Arbeiten ist ersichtlich, daß es sich bei dem Abbau des Glykosamins nicht um eine einfache Desamidierung und darauffolgende Zerstörung nach Art eines stickstofffreien Kohlehydrats handeln kann. Denn die Versuche von Fabian[1] (mit salzsaurem Glykosamin), sowie die von Offer und Fränkel[2] und später von Cathcart[3] (mit der freien Base) beweisen deutlich, daß Glykosaminfütterung keine Glykogenbildung zur Folge hat. Wenngleich die interessanten Untersuchungen Forschbachs[4] über die Ausnutzung des Glykosaminkohlensäureäthylesters, sowie die Versuche von Kurt Meyer[5] mit Acetylglykosamin darauf hindeuten, daß möglicherweise gerade die eigenartige Bindung des Glykosamins im Eiweißmolekül einen wesentlichen Einfluß auf seine Zerstörung im Organismus auszuüben vermag, so steht andererseits schon seit Fabians Untersuchungen fest, daß auch nicht derartig gebundenes Glykosamin zum Teil vom Kaninchen zerstört wird. Über den

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 167—177.
[2]) Zentralbl. f. Physiologie 13.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 423.
[4]) Diese Beiträge 8, 313.
[5]) Ebenda 9, 134.

Weg des Abbaues, sowie über die Mengen, die ein Tier zu zerstören vermag, wissen wir aber vorläufig noch recht wenig.

Die nachstehenden Untersuchungen, die ich auf Herrn Prof. Hofmeisters Veranlassung unternahm, hatten die Aufgabe, diese Lücke auszufüllen. Zunächst galt es, die Größe des Glykosaminverbrauches am lebenden Tiere zu bestimmen. Dann aber zog ich noch eine andere, bisher wenig beachtete, aber in engster Beziehung zum Glykosamin stehende Substanz in den Bereich meiner Untersuchungen.

Es ist bekannt, daß das freie Glykosamin ein recht unbeständiger Körper ist. Lobry de Bruyn untersuchte den sehr komplizierten Zersetzungsvorgang genauer [1]). Dabei fand er, daß die Rechtsdrehung wässeriger und methylalkoholischer Lösungen des Glykosamins bei längerem Stehen langsam zurückging, und daß nach einem Monat aus dem Methylalkohol eines der Zersetzungsprodukte, ein linksdrehender Körper, auskristallisierte, der sich mit einer anderen, vom gleichen Autor durch Einwirkung von ammoniakalischem Methylalkohol auf Fruktose erhaltenen Substanz [2]) als identisch erwies. Gleichzeitig zeigte er, daß die Zersetzung des Glykosamins, „bei der zweifellos Feuchtigkeit und Sauerstoffzutritt, sowie wahrscheinlich Gegenwart freien Alkalis beteiligt sind“, bei mäßig erhöhter Temperatur eine sehr erhebliche Beschleunigung erfährt. Übertrifft doch die Menge des Umwandlungsproduktes bei 32° die bei Zimmertemperatur gebildete um mehr als das Fünffache!

Bot schon allein die Frage nach der chemischen Konstitution dieses einen der Umwandlungsprodukte des Glykosamins genügendes Interesse, so war in Anbetracht des Umstandes, daß sich alle soeben angeführten, die Umwandlung begünstigenden Momente in den Gewebsflüssigkeiten der Tiere finden, die Prüfung der Frage nahegelegt, ob sich nicht auch im lebenden Organismus eine gleiche Umlagerung des freien Glykosamins nachweisen läßt.

2. Über das Fruktosazin und seine Überführung in Pyrazindicarbonsäure.

Um reichlichere Mengen des Umwandlungsproduktes des Glykosamins zu erhalten, benutzte ich das von Lobry de Bruyn angegebene Verfahren der Darstellung aus Fruktose:

[1]) Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas 18, 77—83.
[2]) Ebenda 18, 72—76.

1 kg Fruktose wurde in 5 kg bei gewöhnlicher Temperatur mit NH_3 gesättigtem Methylalkohol gelöst und in einem 10 bis 12 Liter fassenden Standgefäße unter Pergamentpapierverschluß am sonnigen Fenster sich selbst überlassen (nur von Zeit zu Zeit wurde die Lösung durch leichtes Schwenken des Gefäßes gründlich durchgemischt). Binnen 2 bis 2½ Monaten kristallisierte das Produkt, etwa 100 bis 120 g, aus. Es wurde abfiltriert und mittels Tierkohle von anhaftendem gelbem Farbstoff befreit. Die so erhaltene reine Substanz stellt ein schneeweißes, aus kleinen dünnen, quadratischen Blättchen bestehendes, in heißem Wasser leicht, in sehr kaltem Wasser und in Alkohol sehr schwer, in Äther, Petroläther, Essigäther, Aceton, Chloroform, Eisessig, Benzol, auch in geschmolzenem Urethan bzw. Stearinsäure unlösliches Produkt dar, das sich beim Erhitzen auf 210 bis 220° bräunt und sich bei einer Temperatur von 232,5° unter lebhafter Gasentwickelung zersetzt. (Lobry de Bruyn gibt nur „Zersetzung unter Braunfärbung bei 210 bis 220°" an.) Eine 0,86 proz. Lösung dreht im 1 dm-Rohr — 0,691, woraus sich die Drehung $[\alpha]_D = -80,3$ berechnet (L. de Bruyn fand für 1 proz. Lösung $[\alpha]_D = -80,0$). Die Substanz reduziert langsam in der Kälte ammoniakalische Silberlösung, Fehlingsche Lösung erst bei längerem Kochen. Die Substanz gärt nicht mit Hefe.

Auch die Elementaranalyse ergab ähnliche Zahlen, wie sie L. de Bruyn erhalten hat:

0,1038 g Substanz gaben 0,1717 g CO_2 und 0,0608 g H_2O
0,1246 g gaben 10,1 ccm N bei 19° und 724 mm Hg.

	Gefunden	Daneben stelle ich die von L. de Bruyn gefundenen Zahlen	
C	45,11 Proz.	45,5 Proz.	45,2 Proz.
H	6,55 „	6,0 „	6,1 „
N	8,89 „	9,0 „	—

Die gefundenen Werte entsprächen einer Substanz, deren C-, H- und N-Gehalt zwischen

	$C_6H_9NO_4$	$C_6H_{11}NO_4$
C	45,26 Proz.	44,69 Proz.
H	5,70 „	6,88 „
N	8,81 „	8,70 „

liegt.

Lobry de Bruyn stellt die Zahlen nebeneinander, ohne sich für die eine oder andere Formel zu entscheiden, „da ihm die Molekulargewichtsbestimmung fehlte". Dagegen hat er bereits festgestellt, daß salpetrige Säure auf die Substanz nicht einwirkt, und daß der Körper ein „Tetraacetat" zu bilden imstande ist.

Die Frage nach der Molekulargröße suchte ich, da sich kein geeignetes Lösungsmittel für die Substanz fand, mittels Bestimmung der durch ihr Tetraacetat bedingten Gefrierpunktdepression zu entscheiden.

Das nach Lobry de Bruyn dargestellte Tetraacetat schmolz bei 174° und gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0,1472 g gaben 0,2764 g CO_2 und 0,0697 g H_2O.

Somit wurden gefunden:

C . . . . 51,21 Proz.
H . . . . 5,30 „

Mit 1,2574 g dieser Substanz wurde in 17,678 g (= 20 ccm) frisch gefrorenem Benzol die Molekulargewichtsbestimmung vorgenommen.
Es betrug die Gefrierpunktserniedrigung 0,5755°.

Hieraus berechnet sich ein Molekulargewicht von 607,5. Daher muß das der einfachen Formel $C_{14}H_{18}NO_8$ entsprechende Molekül (= 328) verdoppelt werden.

Demgemäß ist als richtige Formel der nicht acetylierten Substanz $C_{12}H_{20}N_2O_8$ anzunehmen, was auch den bei der Analyse gefundenen Zahlen am besten entspricht:

	Berechnet für $C_{12}H_{20}N_2O_8$	Gefunden
C	44,96 Proz.	45,11 Proz.
H	6,29 „	6,55 „
N	8,76 „	8,89 „

Ähnlich beim „Tetraacetat“, besser Octacetat:

	Berechnet für $C_{28}H_{36}N_2O_{16}$	Gefunden
C	51,18 Proz.	51,21 Proz.
H	5,53 „	5,30 „

Über die Verkettung des tertiären N-Atoms mit den C-Atomen gab die Oxydation Aufschluß. Nach mehreren ergebnislosen Versuchen mit verschiedenen Oxydationsmitteln führte nachstehende Methode zum Ziele:

3 g des Glykosaminderivats wurden in 150 ccm 6 proz. Wasserstoffsuperoxyds gelöst. Auf Zugabe von 6 g Natronhydrat in Stangen begann infolge der Erwärmung bei der Lösung des Natrons eine lebhafte Sauerstoffentwickelung, die durch Einstellen in den Brutschrank unterhalten wurde. Am folgenden Tage wurden weitere 5 ccm 30 proz. H_2O_2 (Merck) hinzugegeben und die Oxydation auf dem Wasserbade bei 80° vollendet. Der beste Maßstab für die Vollendung der Reaktion ist das Verschwinden des Reduktionsvermögens der Lösung; es empfiehlt sich daher, so lange mit dem Zusatze kleiner Mengen Wasserstoffsuperoxyds fortzufahren, bis dieser Punkt erreicht ist. Während der Oxydation färbt sich die Lösung zunächst leicht gelb, wird dann wieder fast farblos. Auf Zusatz von starken Mineralsäuren zu den noch heißen Lösungen kommt es unter lebhafter CO_2-Entwickelung zunächst zur Lösung des während der Oxydation sich regelmäßig bildenden Niederschlages; danach aber beginnt die Lösung sich zu trüben, und es fallen beim langsamen Abkühlen lange Kristallnadeln, beim Umschütteln und raschen Erkalten kleinste (mikroskopische) stark glänzende Kriställchen aus. Die Ausbeute beträgt etwa 60 Proz. Durch Behandeln mit Tierkohle oder durch Reinigen über das in Alkohol sehr schwer, in Wasser viel leichter lösliche Ammoniaksalz werden sie von stets anhaftendem gelblichem Farbstoff befreit.

Beim Erhitzen sublimiert die Substanz. Bei 272° zersetzt sie sich. In kaltem Wasser ist sie sehr schwer löslich. Mit Calcium

und Baryum bildet sie sehr schwer lösliche Salze. Ihr Ammoniumsalz ist in Wasser ziemlich leicht, in Alkohol sehr schwer löslich. Sie gibt in wässeriger Lösung mit Eisenvitriollösung eine prachtvolle Violettfärbung.

Beim Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure verlieren die Kristalle erheblich an Gewicht.

0,4542 g lufttrockener Substanz büßten 0,08149 g = 17,94 Proz. an Gewicht ein.

Bei der Analyse der über konzentrierter Schwefelsäure im Vakuum zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz gaben:

0,1708 g 0,2703 g CO_2 und 0,0431 g H_2O,
0,0998 g bei 15,9° und 754,8 mm Hg 14,61 ccm N.

Hieraus berechnet sich die Formel $C_6H_4N_2O_4 + 2H_2O$.

	Berechnet	Gefunden
$2H_2O$	17,65 Proz.	17,94 Proz.

Für die kristallwasserfreie Substanz:

	Berechnet	Gefunden
C	42,94 Proz.	43,17 Proz.
H	2,40 „	2,82 „
N	16,69 „	16,97 „

Auf Grund der Eigenschaften und Zusammensetzung [1]), sowie der Eisenvitriolreaktion ist die Substanz als identisch mit der von Stöhr [2]) beschriebenen Pyrazin-2,5-dicarbonsäure anzusehen [3]).

Das aus Fruktose unter Ammoniakeinwirkung entstandene Produkt, ebenso auch der aus Glykosamin bei der Zersetzung auftretende Körper ist somit als 2,5-Ditetraoxybutylpyrazin (die Anwesenheit von acht Hydroxylgruppen ist durch das Octacetat bei tertiärem N bewiesen) aufzufassen:

```
              N
        HC//  \C—C4H9O4
          |    ||
 C4H9O4—C\   /CH
              N
```

[1]) Stöhr findet für sein analysiertes Präparat genau die gleiche Kohlenstoff- und Wasserstoffzahl, nämlich 43,17 und 2,8 Proz. (Journ. f. prakt. Chem. 47, 488).

[2]) Journ. f. prakt. Chem. 47, 487.

[3]) Seltsamerweise finden sich über den Schmelz- bzw. Zersetzungspunkt der Pyrazin-2,5-dicarbonsäure sehr wechselnde Angaben. Nach Stöhr (Journ. f. prakt. Chem. 47, 487) sublimiert die Substanz aus dem offenen Röhrchen unter Zurücklassung von wenig Kohle gegen 270° und schmilzt im zugeschmolzenen Rohr bei 255 bis 256°, nach Wolf (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 26, 772) bei 282°.

Der Kürze halber sei im folgenden mit Rücksicht auf den Pyrazinkern und die Darstellung aus Fruktose die Bezeichnung Fruktosazin gebraucht.

Die Bildung von Pyrazinderivaten aus Zucker ist schon von Stöhr[1]) bemerkt worden. Er hat den Beweis erbracht, daß unter den aus Traubenzucker sowohl bei Gärung als auch infolge von Ammoniakeinwirkung bei höherer Temperatur entstehenden Basen neben Pyridin auch Pyrazinbasen vorkommen.

Stöhr nahm an, daß die Bildung der Pyrazin- und Pyridinbasen als Produkte der Ammoniakeinwirkung auf Traubenzucker bei Wasserbadtemperatur durch Zerreißen der sechsgliederigen Kohlenstoffkette erfolge, wie ja auch sonst der leichte Zerfall der stark mit Sauerstoff beladenen Zuckermoleküle, namentlich bei Alkalieinwirkung, oft beobachtet sei. Es bliebe dahingestellt, ob etwa die Bildung von Milchsäure oder von Aldehyd vorausgehe. Die Bildung des Fruktosazins aus Glykosamin und aus Fruktose zeigt nun aber, daß eine Spaltung der Kohlenstoffkette keineswegs der Synthese vorauszugehen braucht. Die Bildung aus Glykosamin erfolgt vielmehr anscheinend nach der Gleichung

$$2\,C_6H_{13}NO_5 + O = C_{12}H_{20}N_2O_8 + 3\,H_2O$$

und läßt sich einfach in folgendem Sinne deuten:

```
                      NH2                                   N
                       \                                  //  \
            COH     HC—C4H9O4                          HC      C—C4H9O4
             |       |               →                  |      ||
C4H9O—CH            COH                      C4H9O4—C       CH
              \                                          \\  /
              NH2                                          N
```

Die Bildung aus Fruktose kann durch die Gleichung

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,NH_3 + O = C_{12}H_{20}N_2O_8 + 5\,H_2O$$

ausgedrückt werden. Auch sie ist einfacher durch Anlagerung von Ammoniak an den Kohlenstoff des Carbonyls und nachträgliche Kondensation als durch vorgängigen Zerfall der Kohlenstoffkette zu erklären.

Mit Rücksicht auf die wichtigen Dienste, die mir einige Farbenreaktionen zum qualitativen Nachweise von Pyrazindicarbonsäure und von Fruktosazin geleistet haben, sei darüber nachstehendes mitgeteilt.

---

[1]) Journ. f. prakt. Chem. 54, 481 f.

Pyrazindicarbonsäure gibt (wie schon Stöhr erwähnt) in neutraler oder schwach saurer Lösung mit Ferrosulfat eine prachtvolle, noch bei einer Verdünnung von 1 : 100 000 (nicht zu dünne Schicht!) deutlich erkennbare Violettfärbung, die beim Alkalischmachen verschwindet. Das Ammoniaksalz der Pyrazindicarbonsäure gibt, mit Ferrosulfatlösung versetzt, einen prachtvoll dunkelblauen Farbenton.

Fruktosazin gibt auf Ferrosulfatzusatz nur in schwach sodaalkalischer (nicht in neutraler und nicht in saurer!) Lösung eine violette, in durch NaOH alkalischer Lösung eine dunkelblaue Färbung, die noch bei einer Verdünnung von 1 : 2500 als schön blauviolette Farbe bestehen bleibt.

Unterschichtet man ferner Fruktosazinlösung mit konzentrierter Schwefelsäure, so bildet sich binnen $1/2$ bis $3/4$ Minute ein an Breite langsam zunehmender, zart purpurroter Ring (Glykosamin, Dextrose und Fruktose geben bei der gleichen Probe braunschwarze Ringe).

3. Versuche über das Verhalten von Glykosamin und Fruktosazin im Tierkörper.

Meine ersten Untersuchungen richteten sich auf die Bestimmung der Sättigungsgrenze von Kaninchen für Glykosamin. Chemisch reines, nach dem Verfahren von Breuer[1]) hergestelltes (HCl-freies) Glykosamin wurde in genau derselben Weise, wie sie Blumenthal bei seinen Zuckerinjektionen beschrieben hat[2]), Kaninchen in die Ohrvenen eingespritzt. Unmittelbar vorher, sowie meist 3 und 6 Stunden nachher wurde der Harn durch Katheterisieren den Tieren entnommen und mittels Reduktionsprobe und Polarisation im 1 dm-Rohr auf Anwesenheit von Glykosamin untersucht. Es wurde mit der Injektion von 0,5 g pro Tier — also einer im Verhältnis zum Traubenzucker schon recht geringen Menge — begonnen. Doch mußte bis zu dem außerordentlich kleinen Werte von 0,1 g pro Tier (mittleren Gewichtes) herabgegangen werden, um zu derjenigen Menge zu gelangen, die völlig vom Tiere zerstört wird. War doch sogar die geringe Dosis von 0,15 g in Versuch 10 (Tab. I) noch von vermehrter Rechtsdrehung gefolgt, während die Harne in Versuch 12 und 15 3 Stunden nach Injektion von 0,2 g deutlich Fehlingsche Lösung reduzierten!

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 31, 2194.
[2]) Diese Beiträge 6, 329.

Versuch	Tier	Gewicht g	Glykosamingabe g	Harn vor der Injektion			1. Harn nach der Injektion				2. Harn nach der Injektion				
				Menge ccm	Drehung Grad	Reduktion	nach Stunden	Menge ccm	Drehung Grad	Reduktion	nach Stunden	Menge ccm	Drehung Grad	Reduktion	
1	gelb	etwa 3000	0,5	80	+ 0,23	Sp. Entf.	4	51	+ 0,414	++	8 8	110 135	0,165 0,224	(+) (+)	Stallharn Blasenharn
2	„		0,2	54	?	—	$3^1/_2$	1,7	?	Entf.	—	—	—	—	
3	A	3100	0,5	170	?	—	$3^1/_2$	22	?	++	7	60	?	Entf.	
4	A		0,4	72	+ 0,12	st. Entf.	$4^3/_4$	210	+ 0,26	st. Entf.	—	—	—	—	
5	A		alle 1/4 St. 3×0,2	72	+ 0,15	neg.	$3^1/_4$	125	+ 0,21	+	$6^1/_2$	163	+ 0,04	—	
6	A		4×0,15	12	+ 0,19	Sp. Entf.	3	36	+ 0,89	++	6	110	+ 0,04	st. Entf.	
7	A		4×0,1	500	+ 0,17	st. Entf.	3	96	+ 0,36	st. Entf.	$6^1/_6$	54	+ 0,31	st. Entf.	
8	B	1800	0,35	6,3	+ 0,00	—	$3^1/_4$	39	+ 0,32	++	$6^1/_3$	81	+ 0,66	m. Entf.	
9	B		0,2	150	+ 0,15	Sp. Entf.	3	14	+ 0,37	Sp. Entf.	6	38	+ 0,08	l. Entf.	
10	B		0,15	76	+ 0,05	l. Entf.	etwa 3	50	+ 0,34	Entf.	etwa 6	75	+ 0,14	—	
11	C	2150	0,35	110	+ 0,04	—	„ 3	90	+ 0,44	+	„ 6	44	+ 0,19	m. Entf.	
12	C		0,2	145	+ 0,08	—	„ 3	14	+ 0,59	+	„ 6	36	+ 0,07	st. Entf.	
13	C		0,1	110	+ 0,23	l. Entf.	„ 3	68	+ 0,15	l. Entf.	„ 6	55	+ 0,14	l. Entf.	
14	D	2100	0,35	110	— 0,04	Sp. Entf.	„ 3	41	+ 0,38	++	„ 6	80	+ 0,05	neg.	
15	D		0,2	195	+ 0,07	l. Entf.	„ $2^5/_6$	15	+ 0,78	+	„ $5^{11}/_{12}$	56	+ 0,05	st. Entf.	
16	D		0,1	385	+ 0,14	m. Entf.	„ 3	90	+ 0,18	—	„ 6	43	+ 0,15	Entf.	

(+) = schwache, + = deutliche, ++ = starke Reduktion; (m.), (l.), (st.) Entf. (mäßige), (leichte), (starke) Entfärbung; Sp. = Spur.

Die gefundenen Zahlen sind im Vergleiche zu den von F. Blumenthal[1]) für die verschiedenen Zuckerarten ermittelten Sättigungsgrenzen sehr niedrig. Sie werden von dem schlechtest verbrennbaren stickstofffreien Zucker der Nahrung, der Laktose, um das 2,5 fache, vom Traubenzucker und Fruchtzucker sogar um das 25 fache übertroffen! Die Elimination des überschüssigen Glykosamins erfolgt verhältnismäßig rasch; oftmals scheint sie innerhalb der ersten 3 Stunden vollendet zu sein (Versuch 5, 9, 12, 14 und 15).

Obige Versuchsanordnung gibt keinen Aufschluß darüber, ob etwa im Tierkörper intermediär aus Glykosamin Fruktosazin entsteht. Um darüber Aufschluß zu gewinnen, wurde zunächst die Einwirkung von frischem Leberbrei auf Glykosamin einer genaueren Prüfung unterzogen. Wäre die Leber imstande, Glykosamin in Fruktosazin umzulagern, so müßte sich dies in genau derselben Weise, wie es Lobry de Bruyn für wässerige bzw. alkoholische Glykosaminlösungen beschrieben, an einer Änderung der optischen Drehung erkennen lassen.

Zu den zerkleinerten Kaninchenlebern wurden abgewogene Mengen Glykosamin unter Zusatz eines geeigneten Lösungsmittels gegeben. Sofort und dann nach mehrstündigem Stehen im Brutschranke wurde die optische Drehung der Lösungen bestimmt, indem stets gleiche Volumina entnommen, durch Kochen unter Zusatz von saurem Kaliphosphat enteiweißt, dann auf ein einheitliches Volumen mit Wasser aufgefüllt und durch Schütteln mit Talkum und Filtration geklärt wurden[2]).

Versuch 17. 70 g Kaninchenleber werden mit 150 ccm 0,843 g Glykosamin enthaltender physiologischer Kochsalzlösung übergossen (Gesamtvolum 215 ccm). Drehung: a) sofort + 0,21°, b) nach $2^2/_3$ Stunden + 0,33°, c) nach $5^5/_6$ Stunden + 0,29°, d) nach 24 Stunden + 0,22°.

Versuch 18. 40 g schwere Leber in zwei Portionen geteilt. A. 20 g Leber + 0,9905 g Glykosamin. B. 20 g Leber allein. Beide Male in Ringerscher Lösung.

		A.	B.
Drehung:	Sofort	+ 0,15°	0,04°
	Nach $4^1/_2$ Stunden	+ 0,18°	0,03°
	Nach $20^3/_4$ Stunden	+ 0,20°	0,02°

Versuch 19. A. 25 g Leber + 2 g Glykosamin mit physiologischer NaCl-Lösung auf 150 ccm aufgefüllt und 25 ccm Blut zugefügt. Drehung: sofort 0,31°, nach $3^1/_2$ Stunden 0,35°, nach 24 Stunden 0,31°.

B. 15 g derselben Leber + 0 g Glykosamin mit physiologischer NaCl-Lösung auf 90 ccm aufgefüllt, dann 15 ccm Blut zugefügt. Drehung: sofort 0,16°, nach $3^1/_2$ Stunden 0,09°, nach 24 Stunden 0,03°.

---

[1]) S. a. a. O.

[2]) Vgl. R. Hirsch, Diese Beiträge 4, 535.

In keinem der obigen Versuche war nach Glykosaminzusatz Abnahme der Rechtsdrehung zu erkennen; somit war auch kein Grund zur Annahme einer Fruktosazinbildung gegeben.

Trotz dieses negativen Resultates war aber die Möglichkeit einer Fruktosazinbildung aus Glykosamin im intakten Organismus nicht auszuschließen. Es wurden deswegen Kaninchen mit größeren Glykosamingaben gefüttert und der 24 stündige Harn mit Ferrosulfat auf etwa ausgeschiedenes Fruktosazin geprüft.

Versuch 20. Kaninchen B erhält 2,5 g Glykosamin per os; der in den 6 Stunden danach gesammelte Stallharn gibt mit $FeSO_4$ keine Farbenreaktion; Reduktionsprobe negativ.

Versuch 21. Kaninchen A erhält um 10 Uhr 45 Min., 2 Uhr 45 Min., 6 Uhr 45 Min., 8 Uhr 45 Min. je 0,25 g Glykosamin. Der Stallharn gibt an diesem und am folgenden Tage keine Färbung mit $FeSO_4$.

Versuch 22. Kaninchen C erhält 3 Tage hintereinander je 1,0 g und am 4. Tage 0,85 g Glykosamin. Nur am 4. Tage gibt der Harn auf $FeSO_4$-Zusatz eine deutliche, wenn auch nur schwache Rotfärbung. Reduktionsproben stets negativ.

Versuch 23. Kaninchen A erhält 3 Tage hindurch je 2 g und an 2 weiteren Tagen je 1,5 g Glykosamin. Der Harn gibt schon vor der Glykosaminfütterung eine geringe Farbenreaktion mit Ferrosulfat. Diese nimmt nach den Fütterungen etwas zu, ohne jedoch je so stark zu werden wie nach Fruktosazinfütterung (s. u.). Reduktionsproben stets negativ.

Versuch 24. Kaninchen P erhält 6 Tage hintereinander 2,5 g Glykosamin per os. 2 Tage vorher und während der 4 ersten Fütterungstage gibt der Harn mit $FeSO_4$ mehr schmutzige Färbung (nicht die typische Reaktion), an den weiteren Tagen stets negative Reaktion. Reduktionsproben stets negativ. Auch die täglich bestimmte optische Drehung deutet nicht auf Ausscheidung linksdrehender Substanzen. Die bis zum 5. Tage gesammelten Faeces enthalten keine reduzierenden Stoffe.

Versuch 25. Kaninchen M enthält, nachdem sein Harn 5 Tage hindurch keine Fe-Reaktion gegeben, 6 Tage lang je 3 g Glykosamin per os. Der vom 2. bis 3. Fütterungstage gesammelte Harn gab mit $FeSO_4$ schwach rötliche Färbung, die an den folgenden Tagen wieder verschwand. Die Reduktionsprobe fiel während der 13 Versuchstage stets negativ aus. Die optische Drehung des Harnes schwankte an den Normaltagen und Fütterungstagen gleich erheblich, so daß hieraus keine Schlüsse zu ziehen sind. Die bis zum 4. Fütterungstage gesammelten Faeces reduzierten Fehlingsche Lösung.

In den meisten Fällen blieb also die Farbenreaktion des Harnes auf Ferrosulfatzusatz aus. Nur gelegentlich, und zwar zumeist bei längeren Versuchen (22, 23, 25) gab der Harn eine rötliche Färbung. Da dieselbe jedoch niemals sehr erheblich war, da sie ferner oftmals trotz weiterer Glykosamingaben wieder verschwand (Versuch 22 und 25), und weil endlich gelegentlich auch normale Kaninchenharne (wie weiter unten auseinanderzusetzen sein wird)

die gleiche Farbenreaktion geben, so kann damit der Beweis für den Übergang irgend erheblicherer Mengen des Glykosamins im Tierkörper in Fruktosazin **nicht** für erbracht gelten. Die Berechtigung, aus der Harnuntersuchung einen Schluß auf intermediäre Fruktosazinbildung zu ziehen, glaube ich auf Grund nachstehender Erfahrungen über das Verhalten des Fruktosazins im Tierkörper zu haben.

Die Bestimmung der **Sättigungsgrenze** des Kaninchens für **Fruktosazin** geschah in derselben Weise, die oben für das Glykosamin beschrieben wurde.

Auf Grund nebenstehender Tabelle könnte man die Sättigungsgrenze des Kaninchens für Fruktosazin wie für Glykosamin bei 0,1 g vermuten. Dies trifft jedoch nicht zu. Denn, als ich später bei dem Tiere B (Versuch 31) (dessen Harn nach Injektion von 0,1 g Fruktosazin nur eine ganz unbedeutende Vermin-

Versuch	Tier	Fruktosazin g	Harn vor der Injektion			1. Harn nach der Injektion				2. Harn nach der Injektion			
			Menge ccm	Drehung Grad	Reduktion	nach Stunden	Menge ccm	Drehung Grad	Reduktion	nach Stunden	Menge ccm	Drehung Grad	Reduktion
26	A	0,25	—	+ 0,09	Entf.	etwa 3	27,5	+ 0,01	+	etwa 6	90	+ 0,09	Entf.
27	A	0,15	140	— 0,03	θ	„	24	— 0,14	Entf.	„	26	— 0,07	θ
28	A	0,1	580	+ 0,18	(Entf.)	„	108	+ 0,10	θ	„	190	+ 0,14	θ
29	B	0,2	—	+ 0,10	Entf.	„	7 [1])	— 0,08	+	„	52	+ 0,09	starke Entf.
30	B	0,15	46	+ 0,16	θ	„	32	— 0,09	Entf.	„	21,5	+ 0,00	θ
31	B	0,1	410	+ 0,33	Entf.	„	136	+ 0,29	Entf.	„	128	+ 0,28	geringe Entf.
32	C	0,2	—	+ 0,09	θ	„	31	— 0,06	starke Entf.	„	38	+ 0,21	Entf.
33	C	0,12	100	+ 0,05	θ	„	36	— 0,04	Spur Entf.	„	26	+ 0,01	θ
34	C	0,1	475	+ 0,16	θ	„	104	+ 0,14	θ	„	144	+ 0,14	v

[1]) Um alle Untersuchungen durchführen zu können, wurden die 7 ccm mit aq. dest. auf 21 ccm aufgefüllt.

derung der Rechtsdrehung aufwies, die man sehr wohl bei fehlender Reduktion als innerhalb normaler Grenzen gelegene Schwankung anzusehen geneigt sein könnte) den Versuch wiederholte (Versuch 34a) und mit Eisensulfat auf ausgeschiedenes Fruktosazin prüfte, erhielt ich noch deutliche Farbenreaktion. Daß in der Tat unverändertes Fruktosazin nach intravenöser Zufuhr im Harne zur Ausscheidung gelangt, zeigt ein weiterer Versuch (35), bei dem es gelang, aus dem Harne eines Kaninchens, das an einem Tage 0,5 g, am folgenden 0,2 g Fruktosazin bekommen hatte, das im Sediment auskristallisierte Fruktosazin wiederzugewinnen und nach Kristallform und Zersetzungspunkt zu identifizieren. Fruktosazin dreht die Ebene des polarisierten Lichtes etwa ebenso stark nach links als Glykosamin nach rechts. Während aber die vermehrte Rechtsdrehung des Harnes nach Glykosamininjektionen zumeist in der in der 6. Stunde nach der Injektion gewonnenen Harnprobe wieder verschwunden war, zieht sich die Fruktosazinausscheidung viel länger hin. Besonders klar tritt das lange Verweilen dieser Substanz im Körper bei Fütterungsversuchen zutage:

Versuch 36. Kaninchen C erhält 2,5 g Fruktosazin per os; am Abend des gleichen Tages nur Andeutung von $FeSO_4$-Reaktion. 4 Tage danach gibt der Harn mit $FeSO_4$ intensive Rotfärbung.

Versuch 37. Kaninchen B enthält 5 g Fruktosazin. Der Harn zeigt 6 Tage hindurch starke, weitere 2 Tage schwache Reaktion mit $FeSO_4$ (Rotfärbung).

Versuch 38. Kaninchen C erhält 3 g Fruktosazin. Harn bis zum folgenden Tage zeigt nur unbedeutende, der vom 4. bis 5. Tage sehr starke, der vom 6. Tage wieder geringe Reaktion (stets Rotfärbung).

Versuch 39. Kaninchen C enthält 2,5 g am 1., 1,5 g am 2. und 3. Tage. Der bis zum 2. bzw. 3. Morgen gesammelte Harn gibt nur geringe, der bis zum 4. und 5. gesammelte sehr starke, der vom 6. wieder nur geringe Eisenreaktion (Rotfärbung, später auch Blauviolettfärbung auf Zusatz von Na_2CO_3).

Versuch 40. Kaninchen C erhält 7 Tage je 2 g, dann weitere 4 Tage je 1 g Fruktosazin. $FeSO_4$-Reaktion in den ersten 48 Stunden gering, dann weitere 5 Tage sehr stark, darauf allmählich abnehmend. Am 3. Tage treten leichte Durchfälle auf. Vom 7. Tage ab macht das Tier einen kranken Eindruck; es bekommt ein struppiges Fell, behält leichten Durchfall und leidet an Speichelfluß. Am 14. Tage stirbt es. Die Sektion ergibt seröse Ergüsse in Abdomen und Pericard, retroperitoneales Ödem, Lungenödem.

Versuch 41. Kaninchen J erhält 5 Tage je 1,5 g und weitere 12 Tage je 1 g Fruktosazin. Erst der nach 3 Tagen ausgeschiedene Harn reagiert deutlich mit Eisensulfat. Bis zum 16. Tage bleibt die Reaktion sehr deutlich, dann klingt sie bis zum 22. Tage ab und verschwindet vom 24. ab ganz. Neben dem anfänglich roten Farbenton bei der Fe-Reaktion tritt später

auch der blauviolette, auf unverändertes Fruktosazin zu beziehende auf. Pyrazindikarbonsäure konnte nicht isoliert werden. Längere Fütterung mit 1,5 g hatte Auftreten reduzierender Substanzen im Harne zur Folge (wegen gleichzeitiger Fruktosazin-$FeSO_4$-Reaktion wohl auf unverändertes Fruktosazin zu beziehen). Die in vier Intervallen untersuchten Faeces reduzierten nur einmal Fehlingsche Lösung in geringem Grade.

Versuch 42. Kaninchen K erhält 2 Tage nacheinander 1,5 g Fruktosazin. Am 3. Tage tritt ganz geringe Spur Blaufärbung auf, am 4., mehr noch am 5. und 6., starke Rotfärbung, die am 7. Tage wieder geringer wird und vom 8. ab völlig verschwindet. Am 5. Tage reduzierte der Harn Fehlingsche Lösung. Die bis zum Morgen des 5. Tages gesammelten Faeces enthalten kein Fruktosazin.

Versuch 43. Kaninchen L erhält 3 Tage 0,5, dann 4 Tage 1,5 und am 8. und 10. Tage je 1,0 g Fruktosazin. Erst am Morgen des 4. Tages gibt der Harn mit $FeSO_4$ Rotfärbung, am 7. Tage tritt daneben der blauviolette Farbenton des unveränderten Fruktosazins auf, gleichzeitig reduziert der Harn Fehlingsche Lösung. Am dritten Morgen nach der letzten Fruktosazingabe ist zum letzten Male mit $FeSO_4$ schwache Rotfärbung zu erhalten. Vom 2. bis 3. Tage bestand leichter Durchfall, der trotz größerer Gaben vom 4. Tage ab wieder aufhörte. Die in zwei Intervallen (am 2. und 8. Tage) untersuchten Faeces reduzierten Fehlingsche Lösung oder gaben mit $FeSO_4$ Rotfärbung.

Am 16. Tage (also nachdem das Tier 6 Tage lang kein Fruktosazin mehr bekommen hatte) fraß das Tier nicht mehr; um 11 Uhr starb es. Die sogleich vorgenommene Sektion ergab starke venöse Stauung in allen Organen. Der vom vorletzten bis zum letzten Tage gesammelte Harn enthielt nur Spuren von Eiweiß (Hellersche Probe).

Versuch 44. Kaninchen O erhält 4 Tage 2 g und am 5. und 7. Tage je 1 g Fruktosazin. Erst am Abend des 4. Tages deutliche Fe-Reaktion. Sie bleibt 3 Tage sehr stark, dann nimmt sie langsam an Intensität ab, um am 6. Morgen nach der letzten Gabe völlig zu verschwinden. Am 5. bis 7. Tage reduziert der Harn; neben dem roten Farbenton tritt auch der blaue, auf unverändertes Fruktosazin zu beziehende auf. Die am 5. Tage untersuchten Faeces geben mit Ferrosulfat die Fruktosazinreaktion.

Versuch 45. Hund, 8 kg schwer, erhält 5 g Fruktosazin mit dem gewöhnlichen Futter. Der bis zum folgenden Tage gesammelte Harn gibt nur eine Spur von Fe-Reaktion. Am 3. Morgen Rotfärbung neben blauviolettem Farbenton, am 4. und 5. Tage noch stärkere Rotfärbung. Am 6. Tage ist sie nur noch mäßig stark; vom 7. ab fehlt sie. Der Harn entfärbte Fehlingsche Lösung gelegentlich wohl stark, gab aber keine Abscheidung von Cu_2O.

Versuch 46. Derselbe Hund erhält zweimal 4 g Fruktosazin an 2 aufeinanderfolgenden Tagen. Erst der vom 2. bis 3. Morgen gesammelte Harn gab starke Eisenreaktion, die bis zum 8. Tage nachweisbar blieb.

In allen Versuchen, bei denen nach Fruktosazingaben der Harn mit $FeSO_4$ untersucht wurde, trat deutliche Farbenreaktion auf, mochten dem Tiere 5 g oder nur 0,1 g Fruktosazin beigebracht sein (Versuch 37 und 45 bzw. 34 a). Doch stellte sie sich meist

erst am 2. oder 3. Tage nach der Fütterung ein, nahm etwa am 4. und 5. Tage noch an Stärke zu, um dann langsam abzuklingen und endlich ganz zu verschwinden (Versuch 38, 39, 42 und 46). Bei wiederholten Gaben zog sich die Ausscheidung der mit $FeSO_4$ reagierenden Substanzen entsprechend länger hin (Versuch 40, 41, 43 und 44). Doch handelte es sich dabei keineswegs nur um unverändertes Fruktosazin [1]). Vielmehr trat daneben ein anderer Körper im Harn auf, der Fehlingsche Lösung nicht reduzierte, und der mit Ferrosulfat eine auch in deutlich essigsaurer Lösung bestehen bleibende karminrote Färbung gab. Wenngleich ich noch nicht über die Isolierung dieses Körpers berichten kann, so glaube ich doch auf Grund der Art der Farbenreaktion, sowie der außerordentlich großen Wasserlöslichkeit behaupten zu dürfen, daß er sowohl von Fruktosazin als auch von Pyrazindicarbonsäure chemisch verschieden ist. Unverändertes Fruktosazin trat in bedeutenderer Menge nach einmaliger Fütterung mit großen Dosen oder nach länger dauernder Verabfolgung mittlerer Dosen auf, erkennbar an der in alkalischer Reaktion mit $FeSO_4$ auftretenden Violettfärbung [2]) und der positiven Reduktionsprobe.

Trotz der nicht allzugroßen Löslichkeit war die Resorption des Fruktosazins entschieden nicht schlecht. Nach längere Zeit hindurch verabfolgten Gaben von 1 g wurde kein Fruktosazin in den Faeces gefunden. Wohl aber bei mehrtägigen Gaben von 1,5 g. (Das Auftreten von reduzierenden Substanzen in den Faeces bei Durchfall nach zweimaliger Gabe von 0,5 g [Versuch 43] widerspricht dem natürlich nicht.)

Ob der Tod der Kaninchen C (Versuch 40) und L (Versuch 43) auf die Fruktosazinfütterung zurückzuführen ist, bleibt dahingestellt. Das gute Befinden aller anderen Tiere, die teilweise noch größere Fruktosazingaben erhalten hatten, sowie der Umstand, daß das Tier L erst am 6. Tage nach der letzten Fruktosazingabe gestorben, machen dies wenig wahrscheinlich.

Auch die Pyrazindicarbonsäure wurde, ohne Störung zu verursachen, wenigstens teilweise von den Versuchstieren unverändert ausgeschieden. Bezüglich dieser Substanz kann ich jedoch nur vier Versuche beibringen:

---

[1]) Daß Fruktosazin unverändert die Nieren passieren kann, bewies Versuch 35.

[2]) Die Violettfärbung schwankt vom dunkeln Blauviolett bis fast zum reinen Rot. Offenbar hängt die Farbe im einzelnen Falle von der Menge des vorhandenen Carbonats ab; gelingt es doch, die blaue Farbe der Lösung von Fruktosazin und Eisensulfat in Natronlauge durch Einleiten von Kohlensäure in Blauviolett, Rotviolett, Rot und schließlich in Gelb überzuführen.

Versuch 47. Kaninchen A erhält intravenös 0,1 g Pyrazindicarbonsäure. Am Abend desselben Tages und am folgenden Tage gibt der Harn mit $FeSO_4$ starke Violettfärbung.

Versuch 48. Kaninchen C erhält 2 g durch Na_2CO_3 neutralisierte Pyrazindicarbonsäure per os. Schon am Abend deutliche Violettfärbung des Harnes auf $FeSO_4$-Zusatz. Aus dem bis zum folgenden Morgen ausgeschiedenen Harne kann mittels $CaCl_2$-Fällung und Zerlegen des Niederschlages mit HNO_3 eine Substanz gewonnen werden, die nach Kristallform und Schmelzpunkt mit Pyrazindicarbonsäure übereinstimmt.

Versuch 49. Kaninchen A erhält 2 g Pyrazindicarbonsäure (als Na-Salz) per os. Harne vom 1. bis 3. Tage reagieren deutlich mit $FeSO_4$. Am 4. Tage ist die Reaktion sehr schwach, am 5. Tage bleibt sie aus, erscheint wieder am 6. bis 7. Tage, um vom 8. Tage ab dauernd zu verschwinden.

Versuch 50. Hund (derselbe wie oben) erhält 2,5 g Pyrazindicarbonsäure per os. Am Abend desselben Tages und an den drei folgenden Tagen reagiert der Harn deutlich mit $FeSO_4$ (Violettfärbung). Vom 4. Tage ab wird keine Spur der Reaktion beobachtet. Es gelingt[1], aus den gesammelten Harnen 0,708 g fast reiner Substanz zu erhalten, die sich nach Umkristallisieren bei 272° zersetzt. Da etwa $^1/_{10}$ der Harne zu qualitativen Reaktionen verwendet wurde, so ist eine Ausscheidung von 0,8 g Pyrazindicarbonsäure anzunehmen.

Schon bei der Besprechung der Glykosaminfütterungsversuche wurde darauf hingewiesen, daß auch „normale“ Kaninchenharne gelegentlich mit Eisenvitriol eine mehr oder minder deutliche Farbenreaktion geben. So schied das Kaninchen D, das noch niemals zu einem anderen Versuche verwendet worden war, 20 Tage lang einen Harn aus, der mit Ferrosulfat eine Rotfärbung gab, die sehr an jene erinnerte, wie sie nach Fruktosazindarreichung beobachtet wurde. Bei dem Tiere M bestand wieder $1^1/_2$ Tage lang die Ausscheidung eines Körpers, der eine Reaktion zeigte, die eher an das Fruktosazin erinnerte. Dann verschwand die Reaktion für 5 Tage, so daß ich berechtigt zu sein glaubte, mit diesem Tiere einen Fütterungsversuch anzustellen (Versuch 25). Bei dem Tiere E bestand die gleiche Reaktion 3 Tage, um darauf allmählich zu verschwinden.

Der Nachweis, daß das Glykosamin im tierischen Organismus über Fruktosazin abgebaut wird, der das Endziel der Untersuchungen bildete, hat sich somit nicht einwandfrei erbringen lassen. Bei der schlechten Ausnutzung des Fruktosazins würde ein solcher Übergang von Glykosamin in Fruktosazin auch keinen Vorteil für den Organismus bedeuten. Die relativ geringe Angreifbarkeit des

---

[1]) Methode wie in Versuch 49. Doch wurde so lange $CaCl_2$ in Substanz zugefügt, bis das Filtrat mit $FeSO_4$ keine Violettfärbung mehr gab.

Glykosamins und des daraus entstehenden Fruktosazins weist dem Glykosamin überhaupt eine ganz andere physiologische Bedeutung zu als den so leicht zersetzlichen Kohlehydraten der Nahrung und dem Glykogen. Es kommt anscheinend für den Körper mehr als Baumaterial, denn als Energiequelle in Betracht.

Dagegen hat eine andere, auf Grund vorliegender Erfahrungen von Herrn Prof. Hofmeister ins Auge gefaßte Vorstellung, daß eine der Fruktosazinbildung aus Fruktose und Ammoniak analoge Bildung von Pyrazinderivaten im tierischen Organismus stattfindet, bereits durch die von Herrn Prof. Spiro im hiesigen Institute von einem anderen Gesichtspunkte aus durchgeführten Versuche [1]) über Bildung von Pyrazinderivaten bei gleichzeitiger Zufuhr von Fruktose und Glykokoll ihren experimentellen Nachweis gefunden.

Wie Herr Prof. Spiro hervorgehoben hat, läßt dieses Verhalten auf ein Ineinandergreifen des Kohlehydrat- und Eiweißabbaues schließen, das im intermediären Stoffwechsel eine bedeutungsvolle Rolle spielen dürfte. Von diesem Gesichtspunkte aus erscheint der oben mitgeteilte Befund, daß im normalen Harn gelegentlich ein Stoff auftritt, welcher gegenüber Eisenvitriol ein ähnliches Verhalten zeigt, wie es nach Fruktosazindarreichung regelmäßig beobachtet wurde, nicht unwichtig. Die Weiterführung dieser Untersuchung wird lehren, ob man es hier etwa mit dem normalen Produkt eines solchen Ineinandergreifens von Kohlehydrat- und Eiweißabbau zu tun hat.

---

[1]) Diese Beiträge **10**, 285.

III.

Zur Kenntnis der Neutralsalzwirkungen.

Von **Rudolf Höber.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Zürich.)

Eine Anzahl von Untersuchungen der letzten Jahre hat gezeigt, daß die Physiologie der Salze zum Teil mit der Physiologie der Kolloide zu identifizieren ist. Ich selbst glaube für diesen Zusammenhang das plausibelste Beispiel durch meine Versuche über den Einfluß der Neutralsalze auf die Erregbarkeit und die elektrischen Eigenschaften von Muskeln und Nerven [1]) gegeben zu haben. Hier gründet sich die Annahme vom Konnex zwischen Salzwirkung und Kolloidwirkung vornehmlich auf die Übereinstimmung in der Aufeinanderfolge der einerseits nach ihrer physikochemischen, andererseits nach ihrer physiologischen Wirkung geordneten Ionen; die Anionen bilden physiko-chemisch wie physiologisch die bekannte Hofmeistersche Reihe: $SO_4 < HPO_4 < \text{Acetat} < Cl < Br < J$, die Kationen die Reihe $Li < Na < K$, NH_4. Indessen erscheint das Material für die Analogisierung in mancher Hinsicht noch etwas lückenhaft; besonders ergab das physiologische Experiment als vollständige Kationenreihe die Folge $Li < Na < Cs < NH_4 < Rb < K$, an der sofort die absonderliche Stellung des Cs im Verhältnis zu Na, Rb und K auffällt, da doch sonst, d. h. chemisch und elektrochemisch, Cs mit bzw. nach Rb und K rangiert und Na mit Li eine Gruppe für sich bildet. Vor allem erschienen mir deshalb die ergänzenden Untersuchungen über den Einfluß von Cs und Rb im Verhältnis zu dem Einfluß der anderen Alkaliionen auf die Protoplasmakolloide notwendig. Es bleiben aber auch noch einige weitere Fragen zu erledigen, auf die ich später zu sprechen kommen werde [2]).

---

[1]) Pflügers Arch. **106**, 599 (1905) und Zentralbl. f. Phys. **19**, 390 (1905).

[2]) Die Untersuchungen wurden zum Teil in Gemeinschaft mit meinen Schülern Samoiloff, Grober und Kupritz ausgeführt.

1. Der Einfluß der Alkaliionen bei der Fällung von Hühnereiweiß.

Methodik: Hühnereiweiß wurde zu Schaum geschlagen, 24 Stunden in der Kälte stehen gelassen, filtriert und unter Chloroformdampf aufbewahrt [1]). Bei jedem Versuch wurden je 0,5 ccm der Lösung mit 2 ccm der verschiedenen zu vergleichenden Salzlösungen in Reagenzgläsern gemischt und die auftretenden Trübungen miteinander verglichen. Es erwies sich dafür oft als vorteilhaft, nach dem Prinzip des Ultramikroskops das helle Licht eines Auerbrenners durch einen Spalt auf die Gläser fallen zu lassen und senkrecht zum Lichtbündel auf diese zu blicken, während das Auge gegen das Licht geschützt ist. Die verwendeten Salze stammten von der Firma Kahlbaum. Wegen leichter Trübung der Lösungen mußten Rubidium- und Cäsiumchlorid umkristalliert werden, bei letzterem half ich mir öfter auch durch Filtrieren der Lösungen.

a) Fällung mit Chloriden.

4,0 n - Chloride.

	Sofort nach Mischung	Nach 24 Stunden
Li . .	eine Spur erdig. Trübung	etwas erdig getrübt
Na. .	zart opaleszent	zart opaleszent
Cs . .	stärker opaleszent	feinstkörnige Trübung in klarer Flüssigkeit
Rb. .	noch stärker	stärker opaleszent
K . .	noch stärker	noch stärker

Resultat: Li $<$ Na, Cs $<$ Rb $<$ K.

Die übrigen Versuche verliefen ähnlich; ihre Resultate gebe ich deshalb in abgekürzter Form:

3,5 n: Li $<$ Cs $<$ Na $<$ Rb $<$ K
5 n: Li $<$ Cs $<$ Na $<$ Rb.

Das sehr bemerkenswerte Ergebnis lautet also, daß die Kationenreihe bei der Fällung mit Chloriden mit der früher gefundenen physiologischen Reihe so gut wie identisch ist.

b) Fällung mit anderen Salzen.

Nun gilt aber die eben genannte Kationenfolge keineswegs unter allen Umständen, sondern sie wechselt je nach dem begleitenden Anion. Bei der Verwendung von Sulfaten findet man folgendes:

[1]) Siehe Pauli, Pflügers Arch. **78**, 315 (1899).

4 n-Sulfate.

	Sofort nach Mischung	Nach 19 Stunden
Li	schwacher Niederschlag	desgleichen
Cs	großflockiger Niederschlag	"
Rb	weiße Fällung	"
Na.	dicke weiße Fällung	"

Resultat: Li < Cs < Rb < Na.

Zu ähnlichen Resultaten führten folgende Versuche:

3 n-Sulfate: Li < Cs < Rb < Na.
5 n-Sulfate: Li < Rb.
1,5 n-Na_2SO_4 + 1,5 n-Chloride: Li < Cs < Rb < Na.
1,5 n-Li_2SO_4 + 1,5 " Li < Rb < K < Na.
1,5 n-Li_2SO_4 + 2,0 " Rb, K < Na.
3,0 n-Na_2SO_4 + 1,5 n-Nitrate: Cs < Li < Rb, K < Na.
2,5 n-Na_2SO_4 + 1,5 " Cs < Li < Rb < K < Na.

In reinen Sulfatlösungen oder in Gemischen von Sulfat- und Chlorid- oder Nitratlösungen steigt also das Fällungsvermögen der Kationen in der Reihenfolge: Li, Cs < Rb < K < Na. Das Na ist also von der Mitte aus Ende der Reihe verschoben worden.

Wieder anders lautet die Aufeinanderfolge bei Verwendung von Sulfat-Jodid- oder Sulfat-Rhodanid-Gemischen.

2,5 n-Na_2SO_4 + 1,5 n-Jodide.

	Sofort nach Mischung	Nach 24 Stunden
Li	alle Lösungen ungefähr gleich schwach opaleszent	Niederschlag
Na.		opaleszent
Rb.		weniger opaleszent
Cs		noch weniger opaleszent

Resultat: Cs < Rb < Na < Li.

Entsprechende Experimente führten zu folgendem:

3 n-Na_2SO_4 + 1,0 n-Jodide: Cs < K, Rb < Li.
3 n-Li_2SO_4 + 1,0 " Rb < Na < Li.
2,5 n-Rb_2SO_4 + 1,5 " Cs < Rb < Na < Li.
1,5 n-NaSCN + 2,5 n-Sulfate: Cs < Rb, Na < Li.

Diesmal ordnen sich also die Kationen in die Reihe der Atomgewichte, das Cs hat den geringsten, das Li den größten Fällungswert.

Gemische von Sulfaten und Bromiden führen zu Reihen, welche in der Mitte zwischen den Sulfat-Nitrat- oder den Sulfat-Chloridreihen und den Sulfat-Jodidreihen stehen.

Man sieht, das ganze Verhalten des Hühnereiweißes zu den Salzen ist also ein überaus kompliziertes, viel komplizierter, als man nach den Angaben von Pauli[1]), welcher die eine Reihe K < Na < Li als Ausdruck des Kationenfällungsvermögens aufstellte, hätte erwarten können. Auf eine Deutung dieser merkwürdigen Ergebnisse werde ich erst später zu sprechen kommen. Zum Schluß will ich nur noch einmal darauf hinweisen, daß wenigstens die bei den Chloriden aufgefundene Kationenreihe mit der physiologischen Reihe identisch ist.

2. Der Einfluß der Alkaliionen auf Serumalbumin.

Es erschien von Interesse, die oben mitgeteilten Versuche mit einem reinen Eiweißkörper zu wiederholen; es wurde dafür Serumalbumin gewählt.

Das Serumalbumin wurde in der üblichen Weise aus Rinderblutserum dargestellt; die Globuline wurden mit Magnesiumsulfat entfernt, das Albumin mit Ammonsulfat ausgefällt, wieder gelöst, dialysiert und schließlich mit Alkohol gefällt. Die dann mit dem Niederschlag hergestellte wässerige Lösung enthielt nur 0,06 Proz. Eiweiß. Deshalb wurden bei den Fällungsversuchen die verschiedenen Salze diesmal direkt in der Eiweißlösung aufgelöst.

Die mit dem Präparat erzielten Ergebnisse stimmen in der Hauptsache mit den am Hühnereiweiß gewonnenen überein. Darüber orientieren die folgenden abgekürzten Protokolle:

5 n-Chloride: Li < Na < K.
5 „ Cs < Li, Na < K < Rb.
1 n-Sulfate + 4 n-Chloride: Li < Na < Rb.
3 n-Sulfate: Li < Cs < Rb < Na.
3,5 „ Li < Rb < Na.
4 „ Cs < Li < Na.
2,5 n-Na_2SO_4 + 1,5 n-Jodide: Li < Cs < Rb < Na.
2,5 n-Li_2SO_4 + 1,5 „ Li < Cs < Rb < Na.

Die Chloridreihe ist also ungefähr die physiologische, d. h. Cs steht bei Na und Li; in Gegenwart von Sulfaten lautet die Reihe diesmal unter allen Umständen: Li < Cs < Rb < Na.

Die Anionen wirken auf das Serumalbumin in der gewöhnlichen Weise fällend, d. h. sie bilden die Reihe: J < Br < Cl < Acetat < SO_4.

---

[1]) Diese Beiträge 3, 243 (1902).

3. Der Einfluß der Alkaliionen auf Lecithin.

Untersuchungen über das Fällungsvermögen der Neutralsalze gegenüber dem Lecithin existieren fast noch keine, und doch beanspruchen gerade Daten hierüber für die Erörterung der Frage nach der Physiologie der Salze und deren Konnex mit der Physiologie der Kolloide besonderes Interesse, da es einerseits durch mancherlei Beobachtungen sehr wahrscheinlich gemacht werden konnte, daß der Angriffspunkt der Salze auf die Protoplasten die Plasmahaut ist[1]), und da andererseits die letztere nach Overton zum Teil aus Lecithin konstituiert zu denken ist. Alles, was man bisher von der Fällbarkeit des Lecithins durch Salze weiß, besteht in den Angaben von Koch[2]); dieser fand unter anderem, daß den Salzen der Alkalien überhaupt das Vermögen abgeht, das Lecithin auszufällen. Für das von mir verwendete Präparat gilt dies, wie sich zeigen wird, aber durchaus nicht.

Mir stand durch die große Liebenswürdigkeit von Professor Winterstein für meine Untersuchungen ein sehr sorgfältig gereinigtes Material zur Verfügung; auch an dieser Stelle danke ich ihm vielmals für die Überlassung desselben.

Das Präparat war auf folgende Weise von Winterstein hergestellt: Käufliches Eierlecithin wurde mit viel Wasser in eine Emulsion verwandelt, letztere nach Zusatz von Kochsalz ausgeäthert und die ätherische Lecithinlösung mit Natriumsulfat getrocknet. Nach 24 Stunden wurde der Äther abdestilliert, der Rückstand mit Methylacetat behandelt, wobei ein Präparat resultierte, das in absolutem Äther und auch Alkohol vollständig löslich war. Es wurde bis zu den jeweiligen Versuchen im Exsikkator aufbewahrt. Dann wurde für jede Versuchsserie eine neue Probe mit destilliertem Wasser übergossen und durch ganz sanftes Schütteln in „Lösung" gebracht; letztere wurde zum Schluß filtriert und sofort verwendet.

In den einzelnen Versuchen wurden je 0,5 ccm Lecithinlösung mit 2,0 ccm Salzlösung miteinander vermischt und die entstehenden Trübungen miteinander verglichen.

Ich erhielt folgende Resultate:

4 n-Chloride: sofort nach Mischung leichte, wenig differierende Opaleszenz; nach 16 Stunden: $K < NH_4 < Rb < Li < Na < Cs$.

4 n-Chloride: sofort kein deutlicher Unterschied in den Opaleszenzen; nach 36 Stunden: $K, Rb < NH_4 < Li < Cs < Na$.

4,16 n-Chloride: sofort kein deutlicher Unterschied; nach 21 Stunden: $Rb < NH_4 < Li < Na < Cs$.

[1]) Siehe hierüber: Höber, Physikal. Chem. der Zelle u. der Gewebe, 2. Aufl., S. 259 ff. (1906).

[2]) Zeitschr. f. physiolog. Chem. 37, 181 (1902).

3 n-Sulfate: sofort nach Mischung NH_4 < Rb < Na < Li < Cs; nach 24 Stunden dieselbe Reihe: NH_4 und Rb opaleszent, Na feiner Niederschlag, Li und Cs flockig.

4 n-Sulfate: sofort NH_4 < Rb < Na < Cs < Li.

2,5 n-Na_2SO_4 + 1,0 n-Sulfate: sofort K < NH_4 < Li.

2,5 n-Na_2SO_4 + 1,0 „ „ NH_4 < K < Rb < Li < Cs.

1 n-Na_2SO_4 + 3,5 n-Bromide: „ NH_4, Rb < Cs.

4 n-Sulfate: sofort NH_4 < Rb < Li < Cs < Na; nach 12 Stunden: NH_4, Li < Rb < Cs < Na.

4 n-Sulfate: sofort NH_4 < Rb < Li < Na; nach 20 Stunden: NH_4 < Li < Rb < Na.

Hinzuzufügen ist noch, daß durch die Sulfate, zumal durch Na_2SO_4 und Cs_2SO_4, die Lecithinlösungen allmählich ausgeflockt werden.

Ich komme also zu dem bedeutungsvollen Resultat, daß die Kationen ziemlich in derselben Reihenfolge lecithinfällend wirken, in der sie physiologische Eigenschaften abändern. Denn wenn man davon absieht, daß bei Gegenwart von Sulfaten sich die Kationenreihe mit der Zeit der Einwirkung ändert, wenn man bloß die Anfangswerte in Betracht zieht, so lautet die Fällungsreihe für Lecithin etwa:

K, NH_4 < Rb < Li < Cs < Na,

während ich als physiologische Reihe fand:

K < Rb < NH_4 < Cs < Na < Li;

beide Male rangiert also Cs mit Na und Li und nicht mit K und Rb

Variation des Anions ergab folgendes:

5 n-Na-Salze: J < SCN < Br, NO_3 < Cl < Acetat.
4 n-K-Salze: J < SCN < Br < NO_3, Cl < Acetat.

Vergleichen wir schließlich das Fällungsvermögen der Ionen gegenüber dem Lecithin mit dem gegenüber dem Eiweiß, indem wir für die Eiweißfällung durch Kationen allein die Alkalichloride berücksichtigen, so ergeben sich für Eiweiß die Reihen:

Li < Cs < Na < Rb < K,
SCN < J < Br, NO_3 < Cl < Acetat;

für Lecithin die Reihen:

K, NH_4 < Rb < Li < Cs < Na,
J < SCN < Br, NO_3 < Cl < Acetat.

Die Kationenreihen laufen also in entgegengesetzten Richtungen. Ich komme hierauf noch zu sprechen. —

Wie ist nun die merkwürdige und besonders beim Eiweiß so variable Kationenordnung, wie vor allem die beim Lecithin häufig, beim Eiweiß wenigstens in Gegenwart von Cl auftretende physiologische Reihe zu erklären, da sie doch nicht mit der chemischen bzw. elektrochemischen Anordnung übereinstimmt? Eine Aufklärung erwartete ich durch Ausdehnung der Untersuchungen auf das Gebiet der homogenen Systeme, das eigentliche und ursprüngliche Erforschungsgebiet der „Neutralsalzwirkungen“.

4. Der Einfluß der Alkaliionen auf die Säurekatalyse und die Verseifung von Estern.

Bisher ist allein der Einfluß von Alkaliionen auf die Esterkatalyse untersucht worden, über ihren Einfluß auf die Geschwindigkeit der Saponifikation ist nichts bekannt. Aber auch die Kenntnisse der Alkaliwirkung auf die Esterkatalyse sind nicht ausreichend, vor allem, weil über die Stellung von Rb und Cs Angaben fehlen. Trey[1]) konstatierte mit einer nicht ganz einwandfreien Methodik, daß die Säurekatalyse von Methylacetat durch die Kationen in der Reihenfolge K < Na < Li beschleunigt wird. Für die analoge Säurekatalyse des Rohrzuckers fand dann Spohr[2]) die Reihe K < Na < Li, Arrhenius[3]) die Reihe K < Na < Li, NH_4. Diese Angaben erfahren durch die folgenden Experimente ihre Ergänzung.

a) Neutralsalzwirkung bei der Esterkatalyse.

Die Geschwindigkeit der Esterzersetzung in Gegenwart von Säure wurde im wesentlichen nach der im „Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chemischer Messungen“ von Ostwald und Luther angegebenen Methode bestimmt.

In Reaktionskölbchen von 50 ccm Inhalt wurden je 20 ccm 2 n-Salzlösung und 20 ccm 1 n-Salzsäure gebracht, die Kölbchen wurden dann mit paraffinierten Korken verschlossen, 1 bis $1^1/_2$ Stunde in einen Wasserthermostaten von 25° gestellt und dann mit 2 ccm auf 25° vorgewärmtem Methylacetat versetzt. Sofort nach dem Zusatz wurde das Kölbchen etwa eine halbe Minute kräftig geschüttelt und unmittelbar darauf 2 ccm vom Inhalt zur Titration mit etwa $^1/_{20}$ n-Natronlauge entnommen. Weitere Titrationen folgten von Zeit zu Zeit. Notiert wurde jedesmal die Zeit unmittelbar beim Beginn des NaOH-Zusatzes. Die Temperatur des Thermostaten schwankte innerhalb der mehrstündigen Versuchsdauer um etwa 0,2°. Die Salze waren sorgfältig

---

[1]) Journ. f. prakt. Chem. (2) 34, 353 (1886).
[2]) Zeitschr. f. physik. Chem. 2, 194 (1888).
[3]) Ebenda 4, 226 (1889).

getrocknet. Im allgemeinen wurden die Lösungen durch Wägung der Salze hergestellt, nur die LiCl-Lösung wurde wegen der Hygroskopizität des Salzes gegen 0,1 n-$AgNO_3$ titriert. Die zur Titration verwendeten Bechergläschen waren trocken. Als Indikator diente Phenolphtaleïn.

Die Berechnung der Geschwindigkeit geschah nach der üblichen Formel:

$$\frac{\log (A - a_0) - \log (A - a_t)}{0{,}4343\ t} = K,$$

in der A den Endtiter bedeutet, ausgedrückt in der Anzahl der bei der Neutralisation verbrauchten Cubikcentimeter NaOH, a_0 den Anfangstiter, a_t den Titer zur Zeit t (Minuten).

Die so gewonnenen Werte teile ich in extenso mit.

1. 20 ccm 1 n-HCl + 20 ccm Wasser + 2 ccm Methylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	18,63	—	0	19,1	—
234	30,80	37,14	294,5	32,48	37,76
267,5	31,88	37,39	328	33,32	36,91
298,5	32,74	37,47	429	35,25	37,63
336	33,72	37,88	463	35,78	37,48
424,5	35,40	37,92	494,5	36,15	37,36
∞	39,57	—	∞	39,32	—
∞	39,60	—	∞	39,32	—
—	—	—	∞	39,32	—
	Mittel .	37,56		Mittel .	37,43

2. 20 ccm 1 n-HCl + 20 ccm 2 n-LiCl + 2 ccm Methylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	25,65	—	0	25,52	—
23	28,48	44,15	19	27,86	44,35
155	39,88	43,11	179	41,14	43,20
182	41,65	43,64	195	42,17	43,90
198	42,48	43,39	210	43,00	44,10
213	43,33	43,68	227	43,68	43,47
230	44,35	44,50	249	44,58	43,14
253	45,15	43,60	278	45,87	43,67
335	48,02	43,41	294	46,40	43,45
∞	54,83	—	314	47,07	43,41
∞	54,85	—	330	47,58	43,50
—	—	—	∞	54,44	—
—	—	—	∞	54,50	—
	Mittel .	43,56		Mittel .	43,62

3. 20 ccm 1 n-HCl + 20 ccm 2 n-NaCl + 2 ccm Methylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	25,82	—	0	25,53	—
169	41,00	43,76	25	28,53	43,70
199	42,50	42,92	185	41,51	43,40
213	43,26	43,07	200	42,33	43,42
229	43,90	42,54	215	43,13	43,56
244	44,80	43,46	231	43,81	43,21
269	45,62	42,57	255	44,90	43,37
283	46,30	43,16	269	45,50	43,51
299	46,95	43,49	285	46,10	43,51
315	47,50	43,57	301	46,65	43,44
336	48,16	43,65	321	47,30	43,44
352	48,63	43,74	∞	54,41	—
∞	54,87	—	∞	54,54	—
∞	54,84	—	—	—	—
	Mittel .	43,27		Mittel .	43,46

4. 20 ccm 1 n-HCl + 20 ccm 2 n-KCl + 2 ccm Methylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	18,62	—	0	18,80	—
315	33,78	42,31	274,5	32,92	41,23
350,5	34,56	41,43	305	33,68	41,04
390,5	35,36	41,74	343	34,60	41,38
435	35,92	40,86	381	35,38	41,67
476	36,62	42,00	425	36,11	41,78
∞	39,44	—	468,5	36,68	41,56
∞	39,44	—	∞	39,65	—
—	—	—	∞	39,63	—
	Mittel .	41,67		Mittel .	41,44

5. 20 ccm 1 n-HCl + 20 ccm 2 n-RbCl + 2 ccm Methylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	19,03	—	0	19,08	—
386	35,39	41,58	380	35,29	41,46
411	35,71	41,68	405	35,74	41,66
473	36,65	41,58	436,5	36,22	41,78
509,5	37,09	41,92	503	36,93	41,08
∞	39,52	—	∞	39,54	—
∞	39,50	—	∞	39,50	—
—	—	—	∞	39,52	—
	Mittel .	41,69		Mittel .	41,49

6. 20 ccm 1 n-HCl + 20 ccm 2 n-CsCl + 2 ccm Methylacetat.

t	*a*	*K*	*t*	*a*	*K*
0	37,02	—	0	37,10	—
108	52,45	40,98	103,5	51,85	40,23
256	64,84	40,42	252,5	64,81	40,40
279	66,28	40,62	273	66,10	40,52
328	68,73	40,48	301,5	67,62	40,42
355	69,85	40,80	355	70,05	40,25
411	71,80	40,07	382,5	71,34	40,71
437	72,70	40,14	406,5	72,10	40,57
464,5	73,48	40,13	431,5	72,96	40,74
486,5	74,11	40,34	462	73,80	40,64
∞	80,21	—	479,5	74,35	40,96
∞	80,13	—	∞	80,41	—
—	—	—	∞	80,44	—
	Mittel .	40,44		Mittel .	40,55

Folgende Geschwindigkeitskonstanten wurden also gefunden:

	1.	2.	Mittelwerte		1.	2.	Mittelwerte
—	37,56	37,43	37,49	K . .	41,67	41,44	41,56
Li . .	43,56	43,62	43,59	Rb .	41,69	41,49	41,59
Na .	43,27	43,46	43,36	Cs .	40,54	40,55	40,54

Sämtliche Chloride der Alkalien steigern also die Geschwindigkeit der Esterkatalyse, CsCl am wenigsten, LiCl am meisten, sie ordnen sich nach ihrem Einfluß in die Reihe:

$$Cs < Rb,\ K < Na < Li,$$

also in die Reihe der Atomgewichte.

b) Neutralsalzwirkung bei der Esterverseifung.

In Kölbchen von etwa 180 ccm Inhalt wurden je 80 ccm 2 n-Salzlösung und 40 ccm etwa $^1/_{30}$ n-Äthylacetatlösung vermischt und 1 bis $1^1/_2$ Stunden im Thermostaten von 25° stehen gelassen; dann wurden 40 ccm $^1/_{36}$ n-NaOH zugefügt. Hierauf wurde nur ganz kurz geschüttelt und dann 10 ccm mit $^1/_{200}$ n-HCl titriert. (In den Versuchen mit RbCl und CsCl wurden kleinere Volumina verwendet und auch jedesmal nur 2 ccm zur Titration entnommen. Die nach der weiterhin angegebenen Formel berechneten Geschwindigkeitskonstanten sind daher für diese Versuche im Verhältnis zu den übrigen Versuchen 5 mal zu groß, sind also, um mit den übrigen Werten vergleichbar zu sein, durch 5 zu dividieren.) Die Reaktion spielt sich sehr rasch ab, deshalb muß die erste Titration so schnell wie möglich nach dem NaOH-Zusatz ausgeführt werden; aus dem gleichen Grunde wurde auch zuerst die langsam aus der Pipette ausfließende Esterlösung mit der Salzlösung vermischt und danach erst die schneller ausfließende NaOH-Lösung zugefügt.

Die Berechnung der Konstanten geschah in der üblichen Weise nach der Gleichung:

$$\frac{\log a_t + \log (a_o - a_e) - \log a_o - \log (a_t - a_e)}{a_e \, . \, t \, . \, 0{,}4343} = K,$$

in der a_o, a_e und a_t die Titer zu Anfang, zu Ende und zur Zeit t (Sekunden) bedeuten.

Folgende Werte wurden bestimmt:

1. 40 ccm $^1/_{36}$ n-NaOH + 80 ccm Wasser + 40 ccm $^1/_{30}$ n-Äthylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	38,91	—	0	38,10	—
838	20,22	29,99	987	18,93	29,94
1045	18,16	29,80	1188	16,80	29,65
1947	12,46	30,40	1372	15,37	29,97
2222	11,50	30,15	2018	12,08	29,93
2449	10,72	30,19	2228	11,30	30,12
∞	1,42	—	∞	1,18	—
∞	1,42	—	∞	1,15	—
	Mittel .	30,11		Mittel .	29,92

2. 40 ccm $^1/_{36}$ n-NaOH + 80 ccm 2 n-LiCl + 40 ccm $^1/_{30}$ n-Äthylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	39,95	—	0	39,82	—
624	24,38	26,78	547	25,58	26,81
902	20,93	26,41	1772	14,42	26,81
1752	14,54	26,81	1937	13,65	26,59
2192	12,69	26,63	2147	12,80	26,53
∞	1,46	—	∞	1,35	—
∞	1,48	—	∞	1,35	—
∞	1,44	—	—	—	—
	Mittel .	26,66		Mittel .	26,69

3. 40 ccm $^1/_{36}$ n-NaOH + 80 ccm 2 n-KCl + 40 ccm $^1/_{30}$ n-Äthylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	39,82	—	0	38,66	—
508	26,18	26,69	540	25,15	27,12
1180	18,29	26,70	826	21,14	26,96
1414	16,70	26,87	1466	15,84	26,86
1582	15,46	26,81	1740	14,44	26,89
1780	14,41	27,06	1910	13,45	27,01
2172	12,67	26,85	2360	11,78	26,82
∞	1,48	—	∞	1,30	—
∞	1,44	—	∞	1,12	—
	Mittel .	26,83		Mittel .	26,94

4. 40 ccm $^1/_{36}$ n-NaOH + 80 ccm 2 n-RbCl + 40 ccm $^1/_{30}$ n-Äthylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	8,55	131,4	0	9,06	—
1123	3,88	133,2	430	6,03	137,4
1282	3,66	137,2	743	4,91	135,4
1468	3,32	137,9	1057	4,10	137,8
1650	3,10	135,2	1223	3,81	136,2
1830	2,94	131,9	1380	3,56	135,6
2050	2,78	133,4	1540	3,38	132,9
2388	2,50	—	1760	3,10	134,2
∞	0,43	—	1940	2,90	135,2
∞	0,43	—	∞	0,46	—
∞	0,43	—	∞	0,46	—
	Mittel .	135,0		Mittel .	134,9

5. 40 ccm $^1/_{36}$ n-NaOH + 80 ccm 2 n-CsCl + 40 ccm $^1/_{30}$ n-Äthylacetat.

t	a	K	t	a	K
0	8,51	—	0	7,98	—
382	6,06	136,1	1253	3,59	137,4
558	5,36	136,0	1447	3,33	136,8
942	4,25	138,5	1845	2,93	134,9
1517	3,29	139,0	2197	2,60	138,4
2157	2,70	135,4	∞	0,58	—
2392	2,53	135,1	∞	0,59	—
2615	2,40	134,2	—	—	—
∞	0,58	—	—	—	—
∞	0,50	—	—	—	—
	Mittel .	136,3		Mittel .	136,9

Folgende Konstanten wurden also ermittelt:

	1.	2.	Mittelwerte
—	30,11	29,92	30,01
Li . . .	26,66	26,69	26,67
K . . .	26,83	26,94	26,88
Rb . . .	27,00	26,98	26,99
Cs . . .	27,26	27,38	27,32

Die Chloride der Alkalien vermindern also die Geschwindigkeit der Saponifikation, CsCl am wenigsten, LiCl am meisten; die Geschwindigkeit steigt in der Kationenreihe:

$$\text{Li} < \text{K} < \text{Rb} < \text{Cs},$$

also in der Reihe der Atomgewichte.

Vergleicht man dies Ergebnis mit dem Ergebnis der Katalysenversuche, so sieht man, daß die Ionen im sauren Reaktionssystem in der umgekehrten Reihenfolge die Reaktion begünstigen, als im alkalischen System. Man wird sofort an den analogen Fall erinnert, welcher vorher hervorgehoben wurde, daß die Kationen auf Eiweiß in der inversen Folge wirken wie auf Lecithin. Damit ist aber die Analogie auch ziemlich erschöpft; denn die Reihenfolge der Kationen ist hier und dort fast durchweg eine andere, nur beim Einfluß des Sulfat-Jodidgemisches auf Hühnereiweiß wurde die Reihe der Atomgewichte ebenfalls gefunden.

Hiernach könnte es scheinen, als ob nur eine recht oberflächliche Vergleichbarkeit zwischen den Neutralsalzwirkungen in homogenen und in kolloidalen Lösungen bestände. Die in Wirklichkeit häufig betonte Verwandtschaft der beiden Gebiete beruhte denn auch bisher in erster Linie auf der Ähnlichkeit der Anionenwirkungen; über die Kationenwirkungen existierten zu wenige Daten. Aber wir werden später sehen, daß auch die Analogie in den Kationenwirkungen sich weit besser durchführen läßt als es bis hierher den Anschein hat. Zunächst sollen jedoch die Anionenwirkungen kurz besprochen werden.

5. Der Einfluß der Anionen auf die Säurekatalyse und die Verseifung von Estern.

Von Spohr[1]) ist gezeigt worden, daß Zusatz von Alkalisulfat die Geschwindigkeit der Esterkatalyse herabsetzt, Zusatz von Chlorid und noch mehr von Bromid sie steigert. Umgekehrt beschleunigen nach Arrhenius[2]) und Spohr[3]) Sulfat und Thiosulfat die Esterverseifung, Acetat, Chlorid, Bromid, Nitrat, Jodid hemmen sie in steigendem Maße. Das Gegenstück zur Esterkatalyse bildet die Rohrzuckerinversion, welche auch durch Sulfat verlangsamt, durch Chlorid und Bromid beschleunigt wird[4]), das Gegenstück der Saponifikation die Umwandlung von Diacetonalkohol in Aceton bei Gegenwart von Basen, wobei Chlorid und noch mehr Nitrat hemmen, Sulfat und Thiosulfat steigern[5]).

[1]) Journ. f. prakt. Chem. (2) 33, 265 (1886). Siehe auch: Ostwald, ebenda 28, 449 (1883).

[2]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 1, 110 (1887).

[3]) Ebenda 2, 194 (1888).

[4]) Löwenthal und Lenssen, Journ. f. prakt. Chem. 85, 321 und 401 (1852). — Spohr, Zeitschr. f. physikal. Chem. 2, 194 (1888).

[5]) Koelichen, Zeitschr. f. physikal. Chem. 33, 176 (1900).

Wir finden also bei alkalischen Reaktionssystemen, daß die Anionen die Reaktion begünstigen in der Reihe:

$$J < NO_3 < Br < Cl < \text{Acetat} < S_2O_3 < SO_4,$$

bei sauren Systemen, daß sie begünstigen in der Reihe:

$$SO_4 < Cl < Br.$$

Also gerade wie wir eben bei den Kationen feststellten, eine Gegensätzlichkeit im Verhalten je nach saurer oder alkalischer Reaktion des Systems!

Da nun, wie weiterhin besprochen werden wird, unter bestimmten Bedingungen die gleichen Anionenfolgen, wie die eben genannten, bei der Neutralsalzwirkung auf Eiweiß und anderes vorkommen, so wurden zur weiteren Durchführung der Analogie zwischen homogenen und kolloidalen Systemen noch einige Verseifungsversuche ausgeführt.

Ähnlich wie die Sulfate wirken nämlich auf die Kolloide Tartrate und Oxalate; danach ist zu erwarten, daß diese die Säurekatalyse hemmen, die Saponifikation beschleunigen. Ersteres ist jedoch nicht ohne weiteres zu ermitteln, da Tartrate und Oxalate die Säurekatalyse schon deshalb verlangsamen, weil sie einen Teil der H-Ionen wegfangen[1]). Die Verseifungsversuche lassen sich jedoch durchführen:

1. 40 ccm $^1/_{36}$ n-NaOH + 80 ccm 2 n-K_2SO_4 + 40 ccm $^1/_{30}$ n-Äthylacetat.

t	*a*	*K*	*t*	*a*	*K*
0	8,80	—	0	8,80	—
697	4,60	156,1	222	6,80	153,8
1072	3,73	151,8	417	5,73	152,4
1482	2,98	159,6	775	4,32	159,8
1682	2,81	154,4	933	3,98	159,3
1972	2,61	150,4	1530	2,92	159,9
2258	2,25	159,3	2133	2,37	156,3
3430	2,17	155,9	2338	2,20	158,8
∞	0,28	—	∞	0,29	—
∞	0,29	—	∞	0,30	—
—	—	—	∞	0,28	—
	Mittel .	155,4		Mittel .	156,7

[1]) Davon, daß das auch für die Salze der relativ starken Oxalsäure gilt, habe ich mich durch Messung geeigneter galvanischer Ketten überzeugt.

2. 40 ccm $^1/_{36}$ n-NaOH + 80 ccm 2 n-$K_2(COO)_2$ + H_2O + 40 ccm $^1/_{30}$ n-Äthylacetat.

t	*a*	*K*	*t*	*a*	*K*
0	8,51	—	0	8,84	—
545	4,98	161,1	738	4,46	159,4
730	4,45	155,8	908	4,05	157,8
900	4,01	155,9	1420	3,13	157,1
1080	3,60	158,6	1560	2,98	155,0
1238	3,29	161,5	1702	2,77	159,3
1547	2,90	159,1	3655	2,32	160,6
∞	0,34	—	∞	0,37	—
∞	0,31	—	∞	0,36	—
∞	0,32	—	∞	0,33	—
—	—	—	∞	0,37	—
	Mittel .	158,7		Mittel .	158,2

3. 40 ccm $^1/_{36}$ n-NaOH + 80 ccm 2 n-$K_2(COO.CHOH)_2$ + 40 ccm $^1/_{30}$ n-Äthylacetat.

t	*a*	*K*	*t*	*a*	*K*
0	8,10	—	0	8,06	—
551	4,70	169,0	826	3,87	168,9
821	3,92	168,3	1122	3,24	171,4
1307	2,94	167,4	1267	3,06	167,2
1755	2,50	167,8	1426	2,82	169,5
2017	2,28	167,4	1555	2,62	174,8
2250	2,10	168,9	1717	2,50	169,6
∞	0,28	—	∞	0,20	—
∞	0,20	—	∞	0,20	—
	Mittel .	168,1		Mittel .	170,2

Die Versuche ergaben also folgende Konstanten[1]), denen ich die vorher bei der Verseifung in Abwesenheit von Neutralsalzen gefundene Konstante beifüge:

	1.	2.	Mittelwerte
—	30,11	29,92	30,01
Sulfat . .	31,08	31,34	31,21
Oxalat . .	31,74	31,64	31,69
Tartrat .	33,62	34,04	33,83

[1]) Die berechneten Konstanten sind aus dem S. 44 angegebenen Grunde wegen der analogen Versuchsausführung sämtlich durch 5 dividiert.

Wie vorauszusehen war, beschleunigen also auch Tartrate und Oxalate die Verseifung.

6. Der Einfluß der Anionen auf Eiweiß und Lecithin.

Bekanntlich stellte Hofmeister fest, daß die Entquellung von Gelatinegallerte und die Fällung von Eierglobulin durch die Anionen der Neutralsalze begünstigt wird in der Reihenfolge:

$$Br < NO_3 < Cl < \text{Acetat} < \text{Tartrat} < SO_4.$$

Das gleiche gilt, wie wir vorher (S. 38 und 40) sahen, auch für Serumalbumin und für Lecithin. Die Anionen wirken also auf die Entmischung dieser kolloidalen Systeme in genau demselben Sinne fördernd ein, wie sie im alkalischen Reaktionssystem die Esterspaltung fördern.

Nun ist aber zuerst von Posternak[1]) und später von Pauli[2]) gezeigt worden, daß, wenn man Eiweißlösungen schwach ansäuert, die Reihe für das Fällungsvermögen der Anionen sich umdreht; die Reihe lautet dann:

$$\text{Acetat} < Cl < NO_3 < Br < J < SCN.$$

Schon vor längerer Zeit habe ich zuerst darauf aufmerksam gemacht[3]), daß das Analogon hierzu der Anioneneinfluß auf die Esterspaltung in sauren Systemen ist; wir sahen, daß die Reihe dort lautet:

$$SO_4 < Cl < Br.$$

Ich habe schon damals hervorgehoben, daß ich die Existenz dieses Parallelismus in den Neutralsalzwirkungen bei homogenen und kolloidalen Systemen nicht bloß für die Aufklärung der bis heute noch ganz rätselhaften Neutralsalzwirkungen für sehr wichtig halte, sondern ich habe auch betont, daß unsere Vorstellungen vom Verhältnis von Lösungsmittel und Gelöstem, die ja noch keineswegs als fixierte gelten können, durch diese Tatsachen bestimmte Direktiven erfahren. Ich bemerke das hier noch einmal, weil ich später zeigen will, daß der Parallelismus weiter geht, als aus dem bisher Gesagten erschlossen werden kann.

Über den Modus der Umdrehung der Anionenfolge ist nun noch folgendes zu sagen von Wichtigkeit: Wenn man zu einer gewöhnlichen oder einer alkalischen Eiweißlösung, in denen beiden die Anionen im gleichen, vorher genannten Sinne fällend wirken können, Säure zusetzt, um die Umdrehung der Anionenfolge her-

[1]) Annales de l'Institut Pasteur **15**, 85 (1901).
[2]) Diese Beiträge 5, 27 (1903).
[3]) Physikal. Chem. der Zelle und der Gewebe, 1. Aufl., 1902.

beizuführen, so kann man bemerken, daß die Umdrehung nicht plötzlich bei einer bestimmten Reaktionsstufe eintritt, sondern daß zwischen den beiden gegensätzlichen Reihen Zwischenglieder mit ganz unregelmäßigen Anionenreihen liegen. Dies ist schon aus den vorher zitierten Untersuchungen von Pauli ersichtlich, geht aber auch besonders deutlich aus folgender Versuchsreihe hervor, die mir einiges physiologisches Interesse zu haben scheint. Man kann nämlich die Umdrehung der Anionenreihe, ohne Änderung der Reaktion mit Säure oder Lauge, auch eventuell einfach dadurch erzielen, daß man die Konzentration der Salze ändert. Pauli[1]) hat gezeigt, daß die Hofmeistersche Anionenreihe auch beim Einfluß der Salze auf die Temperatur der Hitzekoagulation von Hühnereiweiß zur Geltung kommt. Bei Wiederholung seiner Versuche mit noch niedrigeren Salzkonzentrationen fand ich folgendes:

1. Koagulationstemperatur bei 0,5 n-Salzgehalt.

	NH_4	Li	Na	Rb	Cs	K
Acetat .	—	61,8	62,4	—	—	62,0
Cl . . .	61,9	61,6	62,6	61,7	65,7	62,0
Br . . .	61,9	63,6	64,3	—	66,2	66,5
NO_3 . .	62,1	65,8	67,0	—	—	66,4
J	67,2	70,0	70,6	76,2	—	76,5
SCN . .	68,1 ↓	73,9 ↓	76,8 ↓	— ↓	— ↓	77,2 ↓

2. Koagulationstemperatur bei 0,25 n-Salzgehalt.

	NH_4	Li	Na	Rb	Cs	K
Acetat .	— ↑	60,2 ↑	60,2	— ↑	— ↑	60,2
Cl . . .	60,1	60,0	60,6	60,4	61,4	60,2
Br . . .	59,4	59,6	59,6	—	59,4	60,4
NO_3 . .	59,4	60,0	60,6	—	—	60,5
J	57,7	58,6	59,6	57,5	59,0	61,1
SCN . .	56,9	57,6	62,7	—	—	63,3 ↓

3. Koagulationstemperatur bei 0,15 n-Salzgehalt.

	NH_4	Li	Na	K
Acetat	— ↑	59,0 ↑	58,8	59,5 ↑
Cl	59,4	59,0	59,6	59,3
J	57,2	57,5	57,8	57,6
SCN	56,7	57,0	58,0	—

[1]) Pflügers Arch. 78, 315 (1899).

Man sieht, daß bei Verwendung von 0,5 n-Salzlösung die Koagulationstemperatur in der Richtung vom Acetat zum Rhodanid ansteigt, bei Verwendung von 0,15 n-Salzlösung umgekehrt in der Richtung vom Rhodanid zum Acetat. Die Konzentration 0,25 n bedeutet dann aber eine Zwischenstellung; denn bei den Kalisalzen läuft hier die Anionenreihe invers im Verhältnis zu den übrigen Salzen, bis auf die Na-Salze, die indifferent sind bzw. eine irreguläre Anionenstellung bedingen, welche aber auch schon bei den Li-Salzen angedeutet ist.

Man kann sich übrigens leicht davon überzeugen, daß die höhere Salzkonzentration dasselbe leistet, wie ein wenig Lauge, die niedere dasselbe wie ein wenig Säure; die beiden folgenden Tabellen zeigen dies ohne weiteres:

4. Koagulationstemperatur bei 0,5 n-Salz- und 0,015 n-Schwefelsäuregehalt.

	NH_4	Na	K
Acetat . .	— ↑	62,2 ↑	61,9 ↑
Cl	50,7	50,2	50,4
Br . . .	45,4	—	—
NO_3 . . .	—	—	—
J	36,0	39,6	39,4
SCN . .	28,2	37,0	32,0

5. Koagulationstemperatur bei 0,15 n-Salz- und 0,00125 n-Natronlaugegehalt.

	Na	K
Acetat . .	63,6	59,6
Cl	64,6	64,6
J	73,6	78,0
SCN . . .	85,0 ↓	79,4 ↓

Bei 0,5 n-Salzgehalt, bei dem vorher die Anionenreihe vom Acetat zum Rhodanid gerichtet war, läuft sie also unter gleichzeitigem Zusatz von etwas Säure so, wie vorher bei 0,15 n-Salzgehalt, d. h. vom Rhodanid zum Acetat. Und Laugenzusatz bewirkt bei 0,15 n-Salzgehalt gerade das Umgekehrte.

Schließlich ist noch zu sagen, daß man diese Einflüsse der Salzkonzentration nicht bloß bei Hühnereiweiß, sondern auch bei Lösungen von reinen Eiweißkörpern, z. B. von Serumalbumin, beob-

achten kann, wenn man vorher durch geeigneten Lauge- oder Säurezusatz für eine entsprechende indifferente Reaktion sorgt; z. B.:

6. Koagulationstemperatur von Serumalbumin in Kalisalzlösungen.

	0,5 n	0,15 n
Cl	55,6 ↓	47,9 ↑
J	58,0	33,4

Die Prüfung der Reaktion mit der Indikatorenmethode [1]) ergab, daß hier die Umkehr durch Salzkonzentrationsänderung bei einem H^+-Gehalt von etwa 10^{-6} eintrat.

Die angeführten Versuche sind in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Erstens existieren Anhaltspunkte, wenn auch noch keine guten Beweise dafür, daß verschiedene physiologische Funktionen durch die verschiedenen Anionen bald in dem einen, bald in dem anderen Sinne der nun oft genannten Aufeinanderfolge abgestuft werden können [2]); für die Erklärung solcher Erscheinungen kämen die oben angeführten Experimente mit in Frage. Zweitens erweisen sich die Reihen $SO_4 < Cl < Br < J$ und ihr Spiegelbild als Grenzfälle, die mit Bestimmtheit nur bei einem gewissen Grad von saurer oder alkalischer Reaktion auftreten; zwischen diesen Grenzreihen liegen aber, wie wir sahen, alle möglichen Übergangsreihen, die je nach Reaktion und Salzkonzentration verschieden lauten können. Und da wir die Grenzreihen bei ausgesprochen saurer und alkalischer Reaktion auch für die Esterspaltung gültig fanden, so können wir es als wahrscheinlich ansehen, daß auch bei diesem Vorgange in einem homogenen System, oder auch bei ähnlichen Vorgängen im homogenen System, auf welche die Neutralsalze einwirken, eventuell, d. h. bei geeigneter, vom Neutralpunkt nicht weit entfernter Reaktion, die eine oder andere Übergangsreihe in Erscheinung treten kann, welche dann nur im Zusammenhang mit den anderen Reihen, zumal den Grenzreihen, erklärbar wird, während sie ohne Rücksichtnahme auf diesen Konnex den Eindruck einer unverständlichen Ausnahme von der Regel machen muß. Auf solche Ausnahmen bei Vorgängen in homogenen Systemen, die vielleicht als Übergangsreihen zu deuten sind, werde ich nachher zu sprechen kommen.

[1]) Siehe Salm, Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 471 (1907).

[2]) Siehe Höber, Physikal. Chemie der Zelle und der Gewebe. 2. Aufl., 1906, S. 277.

7. Noch einmal der Einfluß der Alkaliionen auf die Fällung von Hühnereiweiß.

Sobald man den Einfluß der Alkalikationen auf den Lösungszustand von Eiweiß in Gegenwart verschiedener Säure- oder Laugenmengen untersucht, so wie es oben in der analogen Art und Weise für den Anioneneinfluß geschehen ist, so werden nun mit einem Male die nach den vorher (S. 36 ff.) angegebenen Experimenten anscheinend so komplizierten Verhältnisse beim relativen Fällungsvermögen der Kationen ganz verständlich. Folgendes wurde früher festgestellt:

1. Die Kationen ordnen sich nach ihrem Fällungsvermögen gegenüber dem Eiweiß in allerlei unregelmäßige Reihen, welche, je nach dem begleitenden Anion, verschieden lauten und welche meist in keiner Beziehung zu der nach der Abstufung der chemischen oder elektrochemischen Eigenschaften gebildeten Reihe stehen (S. 36 bis 38).

2. Beim Einfluß auf die Esterzersetzung ordnen sich die Kationen in eine ganz andere Reihe, als beim Einfluß auf das Eiweiß, nämlich in die Reihe der Atomgewichte; dabei lautet die Reihe für die Wirkung bei alkalischer Reaktion gerade umgekehrt, wie für die Wirkung bei saurer Reaktion (S. 47).

3. In Gegenreihen ordnen sich die Kationen auch, je nachdem sie auf Eiweiß oder auf Lecithin wirken (S. 40).

Vergegenwärtigt man sich jetzt diese Fakten noch einmal, so erinnern sie offenbar an mehrere Erscheinungen, welche soeben beim Studium der Anionenwirkungen erkannt wurden, nämlich:

1. findet man, daß die eben als „Übergangsreihen" gekennzeichneten Anionenfolgen zum Teil je nach dem begleitenden Kation oder auch sonst je nach der Konzentration des Salzes verschieden lauten;

2. ist festgestellt, daß man von dem Gebiete der variablen Übergangsreihen durch Herstellung von saurer oder alkalischer Reaktion zu konstanten Endreihen gelangen kann, welche gleich lauten, aber einander entgegengesetzt gerichtet sind.

Diese Beziehungen legen es nahe, den Kationeneinfluß auf die Kolloide auch in Gegenwart wechselnder Säuren- und Laugenkonzentrationen zu untersuchen.

Darüber existierte bisher bloß die kurze Angabe von Posternak[1]), daß in saurer Lösung das Fällungsvermögen gegenüber

[1]) Annales de l'Institut Pasteur 15, 85 (1901).

Eiweiß steigt in der Reihenfolge: NH_4, K < Na, in alkalischer Lösung in der Reihenfolge: Na < K, NH_4. Diese Angaben werden nun durch die folgenden Beobachtungen an Hühnereiweiß ergänzt:

Fällungsmittel	Kationenfolge
0,03 n-HCl + 0,5 n-Chloride	Cs < Rb < K < Na < Li
0,03 n-HCl + 0,15 n-Bromide	Rb < Cs < K < Na < Li
3,0 n-Na_2SO_4 + 1,5 n-Nitrate . . .	Cs < Li < Rb, K < Na
3—5 n-Sulfate	Li < Cs < Rb < Na
3,5—5 n-Chloride	Li < Cs < Na < Rb < K
0,03 n-NaOH + 0,5 n-Bromide (bzw. 1,0 n-Chloride)	Na < Rb < K < Li < Cs
0,03 n-NaOH + 0,5 n-Chloride	Na < K < Li < Rb < Cs
0,03 n-NaOH + 0,35 n-Chloride	Li < Na < K < Rb < Cs

In dieser Tabelle sind die früher (S. 36 ff.) angegebenen, für die Eiweißfällung geltenden Kationenreihen mit aufgenommen, und ein Blick auf die Tabelle lehrt nun, daß sie am besten als Übergangsreihen aufzufassen sind; die Grenzreihen bildet aber die Reihe der Atomgewichte, im einen Sinne und im Gegensinne angeordnet. Also gerade so, wie im homogenen System, bei der Einwirkung auf die Esterspaltung, ordnen sich auch für das kolloidale System die Kationen nach ihrer Wirkung in die Reihe der Atomgewichte, sobald eine ausgesprochen saure oder alkalische Reaktion besteht. Und zwar begünstigen bei saurer Reaktion die Kationen die Eiweißfällung in der Reihenfolge:

$$Cs < Rb < K < Na < Li$$

gerade so, wie sie (nach S. 44) die Esterkatalyse durch Säure beschleunigen. Für die alkalische Reaktion gilt das Umgekehrte (siehe S. 47).

Damit ist die Analogie der Neutralsalzwirkungen im homogenen System und der Neutralsalzwirkungen im kolloidalen System nunmehr vollkommen durchgeführt, und was etwa zur Erklärung dieser, zumal zur Erklärung der stets besonders die Aufmerksamkeit auf sich lenkenden Umkehr der Salzwirkungen je nach saurer oder alkalischer Reaktion der kolloidalen Lösung angeführt werden kann, das muß darum auch zum Verständnis der vielfach diskutierten und bisher rätselhaften Neutralsalzwirkungen im homogenen System verhelfen.

Bevor ich nun auf die Theorien der Neutralsalzwirkungen eingehe, soll noch eine Hauptkategorie dieser Wirkungen unter den

eben für die gegenseitige Anordnung der wirksamen Ionen gewonnenen Gesichtspunkten kurz betrachtet werden.

8. Die Löslichkeitsbeeinflussung durch Neutralsalze.

Es wurde früher (S. 47) bereits hervorgehoben, daß die Vergleichbarkeit der verschiedenen Neutralsalzwirkungen, die bekannt sind, bisher wesentlich auf der Identität der Anionenreihen beruhte. Es ließe sich eine ganze Anzahl von Beispielen dieser Identität herzählen[1]. Im Gebiete der homogenen Lösungen ist es vor allem der Einfluß der Neutralsalze auf die Löslichkeit, der eingehend untersucht worden ist. Auch hier erstrecken sich die Untersuchungen ganz vorwiegend auf die Feststellung der Löslichkeitserniedrigung durch die verschiedenen Anionen, wobei die oft genannte Reihe:

$$J < Br, NO_3 < Cl < SO_4$$

gefunden wurde. Von Kationen sind im allgemeinen nur K, NH_4, Na und Li geprüft worden. Dabei stellte sich heraus, daß diese die Löslichkeit in steigendem Maße herabsetzen in der Reihenfolge:

$$NH_4 < Li < K < Na.$$

Vom Ammonion wollen wir in dem folgenden absehen, weil in alkalischen Systemen, wie wir sie bei der Untersuchung der Fällbarkeit von Eiweiß und der Esterverseifung benutzten, seine Stellung zu den übrigen Ionen doch nicht eindeutig definiert sein kann, sondern noch von den Dissoziationsverhältnissen, d. h. von der Bildung von freiem Ammoniak, mitbestimmt sein muß.

Vollständigere Kationenreihen sind bisher nur zweimal festgestellt worden. Nach Biltz[2] nimmt bei Verwendung von Nitraten die Löslichkeitserniedrigung für Phenylthiocarbonid zu in der Reihenfolge:

$$Cs < Rb < Li < K < Na,$$

nach Geffcken[3] bei Verwendung von Chloriden und Stickoxydul in der Reihenfolge:

$$Cs < Li < Rb < K < Na.$$

Fragt man nach einer Erklärung dieser Reihen, so ist ersichtlich, daß sie nicht der chemischen bzw. elektrochemischen Reihe entsprechen. Eine Erklärung fehlte bisher. Nach dem Früheren,

---

[1] Eine Zusammenstellung siehe bei Höber, Physikal. Chemie der Zelle und der Gewebe, 2. Aufl., 1906, S. 240 ff.

[2] Zeitschr. f. physikal. Chem. 43, 41 (1903).

[3] Ebenda 49, 257 (1904).

glaube ich nun aber, kann man diese Reihen als Übergangsreihen in dem vorher definierten Sinne auffassen. Dafür läßt sich nämlich erstens anführen, daß die beiden Reihen, je nach dem begleitenden Anion, verschieden lauten, gerade so wie früher festgestellt wurde, daß auch die Kationenfällungsreihe beim Eiweiß mit dem Anion variieren kann. Zweitens wurde zufällig die zweite der oben genannten Reihen auch schon bei der Fällung von Hühnereiweiß durch ein Gemisch von Nitraten und Natriumsulfat eruiert (siehe die Tabelle S. 55).

Wenn diese Auffassung der Reihen als Übergangsreihen richtig ist, so müßte man erwarten, daß in ausgesprochen sauren oder alkalischen Systemen die Kationen sich beim Einfluß auf die Löslichkeit in der chemischen Reihe, in der Reihe der Atomgewichte anordnen, und zwar in sauren Systemen in der umgekehrten Aufeinanderfolge, wie in alkalischen Systemen. Bisher sind aber ganz vorwiegend neutrale Systeme geprüft worden, die Untersuchungen bedürfen also aus den theoretischen Gründen der Ergänzung. Noch ein Moment wäre aber doch vielleicht jetzt schon zugunsten meiner Auffassung zu verwerten, nämlich während nach den bisher vorliegenden Untersuchungen die Kationenreihe eigentlich immer $NH_4 < K < Na$ lautet, lautet sie für die Löslichkeitsbeeinflussung des Ammoniaks nach Abegg und Riesenfeld[1]) $NH_4 < Na < K$. Na und K haben also ihre Plätze in der Art vertauscht, wie es einem alkalischen System entspricht, in dem, nach den Versuchen über Esterverseifung und über Eiweißfällung in Gegenwart von Lauge zu schließen, die Kationenreihe vom Li zum Cs ansteigt.

Daß die Anionen die Löslichkeit in der Reihenfolge:

$$J < Br, NO_3 < Cl < SO_4$$

zu erniedrigen pflegen, wurde bereits gesagt. Es entspricht diese Reihe der früher bei den alkalischen Systemen aufgefundenen. Nach dem eben Gesagten sollte man nun erwarten, daß in sauren Systemen die Anionen die Löslichkeiten im inversen Sinne vermindern. Ob das wirklich zutrifft, muß erst durch Versuche entschieden werden, ebenso wie die Kationenordnung bei deutlich saurer und deutlich alkalischer Reaktion festzustellen ist.

9. Zur Theorie der Neutralsalzwirkungen.

Nach dem Daltonschen Gesetz, in seiner Anwendung auf die verdünnten Lösungen, sollten allgemein zwei Stoffe sich in ihrer

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 40, 98 (1902).

Löslichkeit nicht gegenseitig beeinflussen. Tatsächlich trifft dieses Gesetz für eine sehr große Zahl von Stoffpaaren auch zu. Dagegen gilt es nicht, wenn der eine der gelösten Stoffe ein stark dissoziiertes Neutralsalz ist, vielmehr vermindern das Neutralsalz und der zweite gelöste Stoff im allgemeinen gegenseitig ihre Löslichkeit. Diese Abweichung vom Daltonschen Gesetz, die sogenannte Neutralsalzwirkung, äußert sich, abgesehen von der Erscheinung der Löslichkeitsverminderung, noch in einer ganzen Reihe weiterer Einflüsse der Neutralsalze, in der Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit, der Dissoziation schwacher Säuren, der Dissoziation der Salze selbst. Im Zusammenhang damit steht die innere Reibung, die Oberflächenspannung, die Kompressibilität, die Dichte der Salzlösungen. Denn bei sämtlichen aufgezählten Phänomenen stuft sich die Ionenwirkung, speziell die hauptsächlich untersuchte Anionenwirkung, in der gleichen Ordnung der Ionen ab. Diese Wirkung, die sich also auf einem sehr großen Erscheinungsgebiete äußert, und die nach dem Gesagten in den Rahmen der van t'Hoffschen Gesetze nicht hineinpaßt, vielmehr deren wichtigste Ausnahme bildet, bedarf nun noch der Erklärung; denn keine der Theorien, welche im Laufe der vielfältigen Untersuchung der Neutralsalzwirkungen von verschiedenen Autoren aufgestellt worden sind, trägt allen bekannten Tatsachen Rechnung. Die vorliegende Untersuchung liefert nun für die so oft diskutierte Frage eine Menge neuen Materials, und es bleibt zu prüfen, wie sich dieses zu den bisherigen Erklärungsversuchen verhält, bzw. es bleibt zu erörtern, ob sich nunmehr neue Deutungsmöglichkeiten bieten.

Bisher standen zwei Theorien der Neutralsalzwirkung im Vordergrunde, die Binnendrucktheorie und die Hydrattheorie.

Die Binnendrucktheorie ist in der letzten Zeit hauptsächlich von Geffcken[1]) verfochten worden. Sie gründet sich auf folgendes: Löst man etwa ein Gas in Wasser auf, so nimmt das Volumen zu; erhöht man nun den „Binnendruck" der Lösung, indem man auf sie einen äußeren Druck ausübt, so entweicht Gas, die Löslichkeit des Gases wird also durch Erhöhung des Binnendruckes vermindert. Wie ein äußerer Druck, gerade so soll nun auch Auflösung von Salz den Binnendruck steigern und dadurch die Löslichkeit vermindern. Dafür, daß Salze den Binnendruck

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 49, 257 (1904).

erhöhen, wird von Geffcken zweierlei angeführt: 1. wird die Kompressibilität von Wasser ebensowohl durch wachsenden äußeren Druck wie durch Salzauflösung verkleinert; dabei verkleinern die Alkalisalze die Kompressibilität in der Kationenfolge:

$$NH_4 < Li < K < Na$$

und in der Anionenfolge:

$$J,\ NO_3 < Br < Cl < SO_4,$$

also in derselben Ionenfolge, in der sie gewöhnlich die Löslichkeit vermindern;

2. wird die Temperatur des Dichtemaximums vom Wasser sowohl durch äußeren Druck, wie auch durch Auflösen von Salz erniedrigt. Die Ionen bilden hierbei, nach steigendem Einfluß geordnet, die Reihen:

$$Li < NH_4 < Rb,\ K < Na \quad \text{und}$$
$$Cl < Br < J.$$

Hier lautet also die Anionenreihe gerade umgekehrt als vorher. Begründen läßt sich diese Inversion zunächst wohl nicht weiter, wenn sie auch an die Umdrehungen erinnert, auf welche im Verlaufe dieser Abhandlung mehrfach hingewiesen wurde. Demnach können auf diese Diskrepanz hin wohl Zweifel an der Berechtigung der Binnendrucktheorie auftauchen. Diese werden dann noch entschieden vermehrt, wenn sich konstatieren läßt, daß die Löslichkeitserniedrigung durch Salze viel kleiner ist, als man nach der entsprechenden Erhöhung des Binnendruckes erwarten sollte, und daß vor allem die Löslichkeitserniedrigung keineswegs dem Binnendruck parallel läuft, wie die folgende Tabelle nach Levin[1]) zeigt:

	Relat. äquiv. Löslichkeitserniedrigung	Binnendruck
KJ . . .	10,3	796
KNO_3 .	11,4	847
KBr . . .	13,1	610
KCl . .	23,0	507

Die Binnendrucktheorie erscheint nach all dem nicht hinreichend gestützt.

Die zweite der genannten Theorien, die Hydrattheorie, versucht die Neutralsalzwirkungen auf Konzentrationssteigerung der gelösten Stoffe durch „Wasserentziehung" zurückzuführen,

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 55, 527 (1906).

indem die Bildung von Hydraten aus Salz bzw. Ionen und Wasser angenommen wird (Setschenow, Rothmund, Mc Lauchlan). Wie weit diese Annahme, die augenblicklich äußerst eifrig diskutiert wird, Berechtigung hat, soll hier allein für die uns beschäftigenden Neutralsalze der Alkalien erörtert werden.

Als Anzeichen der Hydratbildung ist neuerdings besonders der Verlauf der Werte für die Gefrierpunktsdepression bei steigender Konzentration verwertet worden. Bei unendlicher Verdünnung beträgt die molekulare Gefrierpunktsdepression Δ_k eines binären Elektrolyten $2 . 18{,}5 = 37^0$. Mit steigender Konzentration sollte nun durch fortschreitenden Rückgang der Dissoziation Δ_k mehr und mehr auf den Endwert $18{,}5^0$ absinken. Tatsächlich findet man aber bei den meisten Salzen, daß nicht bloß die Gefrierpunktsdepression relativ langsam mit der Konzentrationssteigerung sinkt, sondern daß sogar die Werte durch ein oberhalb $18{,}5^0$ liegendes Minimum gehen und dann wieder ansteigen. Dieser Verlauf ist so gedeutet worden, daß jeder Gefrierpunkt die Resultante ist einerseits des jeweiligen Dissoziationszustandes, andererseits des Hydratationsgrades, welcher bei höheren Konzentrationen sich weit mehr geltend macht, als bei großer Verdünnung, wo das Lösungsmittel in großem Überschusse vorhanden ist.

Bezüglich des Gefrierens ihrer Lösungen verhalten sich nun nicht alle Salze gleich abnorm, sondern es gibt vielfache Grade der Abweichung. Bei den Alkalien weicht nach den Untersuchungen von Biltz[1]) das Cs am wenigsten, das Li am meisten ab und man erhält die Anordnung:

$$Cs < Rb < K < Na < Li,$$

also die Reihe der Atomgewichte; die zugehörige Anionenreihe lautet:

$$NO_3 < Cl < Br < J.$$

Man hätte demnach anzunehmen, daß die Hydratation von Cs zum Li und vom NO_3 zum J ansteigt.

Untersucht man die den Gefrierpunktsdepressionen analogen Siedepunktserhöhungen oder Dampfspannungserniedrigungen (Tammann), so erhält man ungefähr dieselben Ionenfolgen. Da auch die Fähigkeit zur Komplexbildung in derselben Richtung steigt, bzw. die Elektroaffinität in der bezeichneten Richtung abnimmt[2]), so

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **40**, 185 (1902).

[2]) Abegg und Bodländer, Zeitschr. f. anorg. Chem. **20**, 453 (1899). — Abegg und Riesenfeld, Zeitschr. f. physikal. Chem. **40**, 98 (1902). — Fox, ebenda **41**, 466 (1902).

wird die Annahme einer Hydratbildung, also eben einer Komplexbildung, nur noch plausibler.

Auf diese Resultate hin wurde aber von Biltz[1]) die Theorie vom Zusammenhang zwischen Hydratbildung und Löslichkeitsbeeinflussung durch die Alkalisalze negiert; denn nach seinen eigenen Messungen erniedrigen die Kationen zusammen mit NO_3 die Löslichkeit in der Reihe:

$$Cs < Rb < Li < K < Na,$$

die Anionen erniedrigen sie in der Reihe:

$$J < Br, NO_3 < Cl < SO_4;$$

die Aufeinanderfolgen sind also ganz andere, als sie nach der Hydrattheorie zu erwarten wären.

Indessen ändert sich möglicherweise die Stellungnahme zur Hydrattheorie auf Grund der Untersuchungen über Löslichkeitsbeeinflussung, welche im vorhergehenden beschrieben worden sind. Nämlich wenigstens unter bestimmten Bedingungen salzen die Alkalisalze in fast genau derjenigen Reihenfolge ihrer Ionen aus, welche die Hydrattheorie erfordert; es wurde ja gezeigt, daß bei saurer Reaktion für das kolloidal gelöste Eiweiß das Fällungsvermögen zunimmt in der Reihenfolge: $Cs < Rb < K < Na < Li$ (S. 55) und: $Cl < Br < NO_3 < J$ (S. 50). Dazu kommt, daß diese Ionenfolgen auch im homogenen, sauren System, nämlich bei der Katalyse von Methylacetat mit Säure, gefunden wurden (S. 44 und 47), und deshalb wurde auch (S. 57) die Vermutung geäußert, daß bei saurer Reaktion auch die Löslichkeitserniedrigung von nicht kolloidal, sondern echt gelösten Stoffen durch Salze nach denselben Ionenreihen erfolgen könnte. Dies ist aber bisher nicht untersucht. Sollte es zutreffen, so würden in der Tat bei einer Anzahl verschiedener Vorgänge die Neutralsalze so wirken, als wenn sie in verschiedenem Maße Hydrate bildeten. Auf der anderen Seite bleibt dann aber natürlich zu fragen, wie es zu erklären ist, daß bei alkalischer Reaktion die Kationen- und Anionenfolgen sich umdrehen, als ob die Hydratationsfähigkeit sich ganz und gar geändert hätte. Bei dieser Fragestellung will ich es vorderhand bewenden lassen und noch nicht versuchen, durch besondere Annahmen über den Zustand der gelösten Stoffe die Tatsachen allgemein zu umschreiben, ich bin aber der Meinung, daß man künftig ohne die Annahme engerer Beziehungen der ge-

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 43, 41 (1903).

lösten Stoffe untereinander, als sie nach der van 't Hoffschen Theorie der Lösungen zu existieren scheinen, nicht auskommen wird, wenn man die hier beschriebenen Versuche erklären will.

Zu dieser Ansicht kommt man auch, wenn man weiterhin die Versuche von noch einem anderen Standpunkt aus betrachtet. Die Versuche haben zum ersten Male gezeigt, daß ein unerwartet weitgehender Parallelismus zwischen den Neutralsalzwirkungen in homogenen Systemen und dem Aussalzen hydrophiler Kolloide besteht. Nun ist man in letzter Zeit mit ziemlichem Erfolge daran gegangen, die Ausflockung der Kolloide durch Elektrolyte zu erklären, und es erscheint darum verlockend, zu sehen, wie weit diese Erklärungen auch auf die Neutralsalzwirkungen in homogenen Systemen passen und zu was für Vorstellungen man so gelangt.

Halten wir uns etwa an die Vorstellungen über den Kolloidfällungsprozeß, die zuletzt auf Grund vortrefflicher Experimente von Freundlich[1]) entwickelt worden sind, so kommt die Ausflockung eines Suspensionskolloids[2]) in der Hauptsache folgendermaßen zustande: Die Ionen des fällenden Elektrolyten werden an der Kolloidoberfläche adsorbiert und die Ausflockung tritt ein, wenn die Ladung der Kolloidteilchen durch die Ionenladungen neutralisiert ist. Die Adsorbierbarkeit der Ionen ist verschieden groß und dadurch ist auch ihr Fällungsvermögen verschieden. Ein Ion hat eine um so größere Fällungskraft, je stärker es adsorbiert wird, vorausgesetzt, daß es die entgegengesetzte Ladung führt wie das Kolloid; ist es aber mit dem Kolloid gleichsinnig geladen, so nimmt gerade umgekehrt seine Fällungskraft ab, je mehr die Adsorbierbarkeit ansteigt. Hiernach wäre die Aussalzung von Eiweiß durch die Neutralsalze etwa auf folgende Weise zu deuten: die Oberflächenspannung der Alkalisalzlösungen wird in der Anionenfolge $SO_4 < Cl < NO_3 < Br < J$ erniedrigt[3]), ein Stoff wird aber um so stärker adsorbiert, je mehr er die Oberflächenspannung herabsetzt, also muß das durch Säurezusatz zu einem positiv geladenen Suspensionskolloid gewordene Eiweiß von J am stärksten, von SO_4 am schwächsten gefällt werden, wie es tatsächlich gefunden ist. Umgekehrt muß dann die Ausfällung von nega-

[1]) Zeitschr. f. Chemie u. Industrie der Kolloide I, Heft 11, 1907. — Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 385 (1906) und 59, 283 (1907).

[2]) Siehe Höber, Physikal. Chemie der Zelle und der Gewebe, 2. Aufl. 1906, S. 208.

[3]) Röntgen und Schneider, Wiedemanns Ann. 29, 165 (1886). — Gouy, Ann. Chim. Phys. (7) 29, 145 (1903).

tivem (Laugen-)Eiweiß durch J am meisten gehemmt, durch SO_4 am meisten gefördert werden. Auch das entspricht den Tatsachen. Es wird also verständlich, warum je nach saurer oder alkalischer Reaktion die Anionenreihen bei der Kolloidfällung konträr verlaufen. Ganz analoge Betrachtungen machen die Kationenwirkung begreiflich. Die Umkehr der Ionenreihen rührt also bei der Kolloidaussalzung von dem verschiedenen Ladungssinn her, der durch die H-Ionen der Säure, die OH^--Ionen der Lauge den Kolloidpartikeln zuerteilt werden kann.

Wollten wir nun diese Anschauungen auf die homogenen Systeme übertragen, so kämen wir zu der Vorstellung, daß auch da das gegensätzliche Verhalten der Salzionen von engeren Beziehungen zwischen H- oder OH-Ionen einerseits, den mit den Salzen zusammen gelösten Stoffen andererseits herrührt. Indessen soll auch hier wieder vorläufig auf den Versuch verzichtet werden, mit Hilfe derartiger Vorstellungen von der Bildung von Komplexen die verschiedenen Neutralsalzwirkungen anschaulich zu beschreiben; zuvor ist es notwendig, alle diese Wirkungen bei wechselnden Reaktionsstufen, von ausgesprochen saurer bis zu ausgesprochen alkalischer Reaktion, genau durchzuuntersuchen.

Zum Schluß seien noch ein paar Worte über Deutungsversuche für den Einfluß der Salze speziell auf die Esterzersetzung gesagt, welche von Arrhenius und von Euler herrühren. Es wurde früher (S. 47) zitiert, daß die Esterkatalyse mit Säure durch Sulfat verlangsamt, durch Chlorid und Bromid beschleunigt wird, und daß umgekehrt die Esterverseifung durch Sulfat beschleunigt und durch Chlorid, Bromid, Jodid verlangsamt wird. Für diese inversen Einflüsse gaben Arrhenius und Euler Spezialerklärungen[1]: die verzögernde Wirkung der Sulfate bei der Esterkatalyse sollte davon herrühren, daß sich HSO_4-Ionen bilden, die verzögernde Wirkung der Halogenionen bei der Verseifung davon, daß sich Molekularverbindungen zwischen Ester und Salzen bilden, oder daß der Zustand der Lauge irgendwie durch die Salze geändert wird. Hierzu ist zu sagen, daß, wenn auch das eine oder andere bis zu einem gewissen Grade zutreffen sollte, doch auf alle Fälle die Erscheinungen bei der Esterspaltung dieselbe Deutung erfordern, wie die übrigen Neutralsalzwirkungen, da die von Arrhenius und Euler speziell ins Auge gefaßten Vorgänge durch die vorliegenden Untersuchungen nur als ein Einzelfall der im

[1]) Siehe Zeitschr. f. physikal. Chem. **32**, 348 (1900) und **36**, 659 (1901).

Gebiete der Neutralsalzwirkungen immer wiederkehrenden Umkehrungserscheinungen charakterisiert werden.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß die Neutralsalzwirkungen in homogenen und in kolloidalen Systemen hochgradig abhängig sind von der Reaktion der Systeme. Bei saurer Reaktion ist die Stufenfolge der einzelnen Kationen und Anionen, welche den Grad ihrer Wirkung bemißt, gerade umgekehrt als bei alkalischer Reaktion. Bei saurer Reaktion lautet die Stufenfolge: $Cs < Rb < K < Na < Li$ und $SO_4 < Cl < Br < J$, bei alkalischer Reaktion lautet sie umgekehrt: $Li < Na < K < Rb < Cs$ und $J < Br < Cl < SO_4$. Bei annähernd neutraler Reaktion kommen gelegentlich unregelmäßige Ionenreihen vor, welche als Übergangsreihen zwischen den eben genannten Endreihen aufzufassen sind. Diese Übergangsreihen haben öfter physiologische Bedeutung insofern, als die physiologische Funktion manchmal nach der Ionenordnung in diesen Übergangsreihen variiert werden kann.

Der Parallelismus in den Erscheinungen der Neutralsalzwirkung bei homogenen und bei kolloidalen Systemen erfordert eine einheitliche Erklärung, welche ohne die Annahme von Komplexbildungen zwischen den einzelnen gelösten Bestandteilen innerhalb der Lösung nicht möglich zu sein scheint.

IV.

Über das spektroskopische und chemische Verhalten des Pigmentsekretes von Aplysia punctata.

Von Dr. **Raffaele Paladino,**
Assistenten des physiologisch-chemischen Instituts.

Aus der chemischen Abteilung der zoologischen Station und dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Neapel.

Das Studium der Farbstoffe, die bei wirbellosen Tieren in Pigmentsekreten, gefärbten Körperflüssigkeiten oder, wie zumeist, im Hautpigment auftreten, besitzt in mehr als einer Richtung Interesse. Nun fehlt es nicht an Angaben über tierische Pigmente überhaupt und über die Pigmentsekrete im besonderen, doch sind sie vielfach einseitig und unvollständig, und eine Wiederaufnahme dieser Beobachtungen schien nicht ohne Interesse. Ich habe daher eine Untersuchungsreihe in Angriff genommen, die vor allem die spektroskopische Charakterisierung solcher Farbstoffe, sodann aber, soweit dies möglich, auch ihre chemische Untersuchung zum Ziele hat.

Wie andere bekannte Aplysiaarten (Seehasen) sezerniert A. punctata drei Arten von Flüssigkeiten, die dem Tiere offenbar als Verteidigungsmittel dienen. Nach A. und G. de Negri ist die eine farblos, von unangenehmem Geruch und wird von der ganzen Manteloberfläche gebildet; die zweite, weiße, stammt aus einer in der Nähe der Geschlechtsöffnung liegenden Drüse; die dritte, von intensiver Färbung, ist das Produkt einer Gruppe von kleinen im Operculum gelegenen Drüsen. Nach Mazzarelli könnten aber alle drei Sekrete von derselben Drüsenart, den sog. Bohatschschen Drüsen, herstammen, in denen drei Arten von sezernierenden Elementen, nämlich Riechstoff, Farbstoff und Schleim bildende Zellen, vorhanden sein sollen.

Bei wiederholter Reizung der Aplysia punctata sieht man vorwiegend die Sekretion der gefärbten Flüssigkeit eintreten, die wegen des hohen Schleimgehalts dickflüssig erscheint und eine sehr schöne intensiv violette Färbung aufweist. Beim Stehen im

Licht an der Luft geht diese Farbe allmählich in Weinrot, bei vieltägigem Stehen endlich in Hellgelb über. Augenscheinlich hat dabei der Sauerstoff der Luft großen Einfluß.

Der violette Farbstoff des frischen Sekrets löst sich gut in gewöhnlichem und in Seewasser, sowie auch in Alkohol. Er wird aus der wässerigen Lösung durch Sättigung mit Ammonsulfat, aus der alkoholischen durch Kochsalzzusatz gefällt. Die neutrale wässerige Lösung gibt beim Aufkochen keinen Niederschlag, nur verändert sich dabei der Farbstoff, so daß nach längerem Kochen die Flüssigkeit lebhaft rot wird.

Verdünnte oder konzentrierte Salzsäure und Schwefelsäure geben bei allmählich erfolgendem Zusatz der violetten Lösung einen mehr rötlichen Stich. Kalte oder warme Salpetersäure, namentlich konzentrierte, führt hingegen einen sehr deutlichen Farbenumschlag in Rot herbei; es gelingt dann nicht mehr, durch Reagenzien, z. B. Ammoniak, die ursprüngliche Violettfärbung wieder herzustellen. Essigsäure, Weinsäure und andere Säuren sind ohne Wirkung.

Verdünnte Lösung von Kalium- oder Natriumcarbonat führt, in wenigen Tropfen zugesetzt, die violette Farbe sofort in intensives Blau und nach dem Erwärmen in Grünlichgelb über. Ebenso wirken andere Alkalien. Ein Niederschlag entsteht nicht. Ammoniak, im Überschuß zugesetzt, erzeugt rubinrote Färbung, die durch Salzsäurezusatz, ohne daß es zu einer Fällung kommt, wieder in das ursprüngliche Violett übergeführt wird. In der Regel wird der durch Säure in wässeriger Lösung veränderte Farbenton bei Neutralisation mit einem geringen Überschuß von Ammoniak nicht mehr in den ursprünglichen übergeführt. Schwefelwasserstoff erzeugt keinen Niederschlag, nur verstärkt er etwas die Intensität der Färbung. Wenige Tropfen Schwefelammon führen das Violett in intensives Rubinrot über. Bei Behandlung mit granuliertem Zink in schwach mit Schwefelsäure angesäuerter Lösung tritt zunächst keine Veränderung ein, später geht unter dem Einfluß des naszierenden Wasserstoffs die Farbe in ein intensives Rosa über. Zusatz von Calciumhypochlorit zerstört das Violett sofort unter Gelbfärbung. Äther färbt sich beim Schütteln mit der wässerigen Lösung gesättigt rot, während die wässerige Lösung violett bleibt. Schwefelwasserstoff und Terpentinöl bieten nichts Bemerkenswertes. Chloroform färbt sich, mit der nativen Lösung geschüttelt, gesättigt rot; beim Schütteln mit der angesäuerten Lösung nimmt es hellblaue Farbe an.

Phosphorwolframsäure erzeugt neben dem Farbenumschlag von Violett in Blau einen Niederschlag. Phosphormolybdänsäure be-

wirkt in der Kälte keine Veränderung, in der Wärme tritt braune Färbung auf, die beim Erkalten in Grün übergeht. Daneben tritt ein Niederschlag auf. Ferro- und Ferricyankalium führen die Farbe in Orangegelb über. Millons Reagens erzeugt starken Niederschlag, der sich beim Erwärmen mit fleischroter Farbe löst. Basisches Bleiacetat bewirkt sofort starken Niederschlag.

Konzentrierte Mineralsäuren fällen nicht, ebensowenig Eisessig und andere Säuren.

Spektroskopisches Verhalten. Das Absorptionsspektrum des ursprünglichen violetten Farbstoffs ist äußerst charakteristisch und gestattet, ihn von ähnlichen organischen Pigmenten und von den Farbstoffen der tierischen Flüssigkeiten leicht zu unterscheiden. Ich habe es daher genauer studiert und auch sein Verhalten Reagenzien gegenüber berücksichtigt. Die umstehende Tafel gibt ein Bild des spektroskopischen Verhaltens.

Das Pigmentsekret selbst ist unverdünnt nicht zur Untersuchung geeignet. Nach Verdünnen mit drei Volumen Wasser gibt es das Spektrum der Fig. 1, ein breites, sehr dunkles Band, das einen Teil des Rot, des Orange, Gelb, Grün und einen großen Teil des Blau (8,0 bis 13,5 der Skala) auslöscht.

Beim Verdünnen mit vier Volumen Wasser (Fig. 2) lassen sich zwei Absorptionsstreifen unterscheiden; der dem roten Rande des Spektrums zu gelegene blässere nimmt einen Teil des Rot, Orange, Gelb und Grün ein (8,0 bis 10,5), der andere stärker ausgeprägte und schmälere löscht nur einen Teil des Blau aus (11,0 bis 13,0).

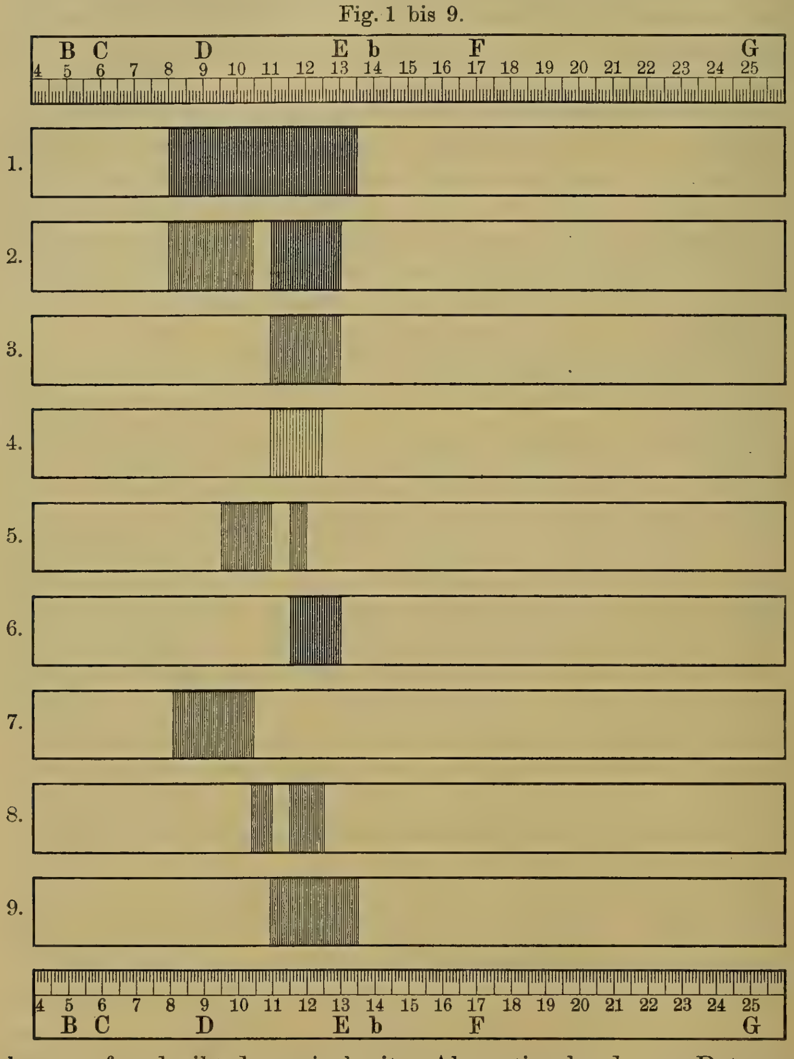
Bei Verdünnung mit fünf Volumen Wasser (Fig. 3) verschwindet das dem Rot zu gelegene Band, während das andere zunächst noch erhalten bleibt (11,0 bis 13,0). Weiterer Wasserzusatz führt allmählich auch zum Verblassen und Schmälerwerden dieses Bandes (Fig. 4), das jedoch erst bei zehnfacher Verdünnung endgültig verschwindet.

Zusatz von Salzsäure oder Essigsäure verändert das Spektrum nicht merklich. Konzentrierte Salpetersäure hingegen, zu der mit vier Volumen Wasser verdünnten Flüssigkeit gesetzt, bewirkt neben dem Farbenumschlag das Verschwinden der beiden Absorptionsbänder (von Fig. 2) und das Auftreten eines Bandes, das einen Teil des Blau auslöscht.

Die beim Schütteln des fünffach verdünnten Pigmentsekrets mit Chloroform erhaltene violette Chloroformlösung weist zwei Absorptionsstreifen auf (Fig. 5), einen breiteren (9,5 bis 11,0) vom äußersten Rot zum Grün und einen sehr schmalen (11,5 bis 12,0)

im Blau. Die überstehende rosafarbene wässerige Lösung zeigt einen stark ausgesprochenen Streifen im Blau (11,0 bis 13,0), ähnlich wie in Fig. 3. Aus der mit Salzsäure angesäuerten Pigmentlösung nimmt das Chloroform den Farbstoff mit intensiv hellblauer Fär-

Fig. 1 bis 9.



bung auf und gibt dann ein breites Absorptionsband vom Rot zum Grün (8,0 bis 10,5) (Fig. 7), das beim Verdünnen schmäler wird, dann aber noch schärfer hervortritt. Die zurückbleibende, intensiv rosafarbene wässerige Lösung weist eine sehr ausgeprägte Verdunkelung im Blau (11,5 bis 13,0, Fig. 6) auf.

Beim Ausschütteln der mit vier Volumen Wasser verdünnten Pigmentlösung mit Äther nimmt dieser rote Färbung an und zeigt zwei Absorptionsbänder, das eine schmälere im Grün (10,5 bis 11,0), das zweite etwas breitere im Blau (11,5 bis 12,5, Fig. 8). Die beim Ausschütteln zurückbleibende, violett gefärbte wässerige Lösung weist eine breite Verdunkelung im Blau auf, ähnlich wie in Fig. 3.

Bei Behandlung der wässerigen Lösung mit Alkohol erhält man eine einzige breite Auslöschungszone (11,0 bis 13,5) im Blau.

Bei dem durch Alkalizusatz bewirkten Farbenumschlag in Blau und Grünlichgelb verschwindet im Spektrum das charakteristische Doppelband (Fig. 2), ohne daß sonst eine bemerkenswerte Änderung einträte.

Schwefelammon bringt ebenfalls das Doppelband zum Verschwinden, es bleibt nur ein Schatten im Grün und Blau zurück. Mit Ferrocyankalium tritt unter Rotfärbung ein Absorptionsband (zwischen 11,0 bis 12,0) auf. Weinsäure schwächt die ursprüngliche Färbung ab, im Spektrum ist dann bloß ein deutlicher Streifen (bei 11,0 bis 12,0) zu beobachten, indem der schwächere, aber breitere Streifen (in Fig. 2) wie bei Verdünnung verschwindet.

Soviel von meinen spektroskopischen Untersuchungen. Aus dem Buche von Fürth[1]) (S. 399) ist zu entnehmen, daß G. de Negri, Moseley und Mac Munn das spektrale Verhalten eingehend untersucht haben. Danach zeigt die wässerige Lösung ein dunkles Absorptionsband im Blaugrün bei *F* und einen helleren Streifen im Hellgrün zwischen *D* und *E*, der sich bei stärkerer Verdünnung in zwei Bänder auflöst. Ferner ergibt sich aus der Arbeit von A. und G. de Negri über die Farbstoffe der Mollusken im Ligurischen Meere, daß in der frisch bereiteten Lösung des Aplysiavioletts drei Absorptionsstreifen, einer im Gelb, ein zweiter im Grün und ein dritter im Grünblau, zu sehen sind, die beiden letzteren deutlicher als der erste, der letzte breiter als die übrigen. In der Chloroformlösung sollen drei Bänder sichtbar sein, zwei sehr nahe bei einander, davon eines sehr deutlich im Orangegelb, das andere hellere im Gelbgrün, sodann ein drittes, das am wenigsten deutliche, im Grünblau. Wie man sieht, weichen die Beobachtungen der früheren Autoren von meinen wesentlich ab, ohne daß ich in der Lage wäre, diesen Widerspruch aufzuklären. Denn man kann diese Verschiedenheiten nicht wohl auf die verschiedene Herkunft der untersuchten Tiere oder auf Ungleichheiten der Ernährung zurückführen.

---

[1]) Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere, Jena 1903, S. 378.

Die chemische Natur des in Rede stehenden Farbstoffs ist, wie auch v. Fürth betont, unbekannt. Der Behauptung von Ziegler und Catalano, es handle sich um einen natürlich vorkommenden Anilinfarbstoff, fehlt eine tatsächliche Grundlage. Ich habe mich bemüht, sicherzustellen, welche Elemente an dem Aufbau des Farbstoffs beteiligt sind. Dazu war eine Reindarstellung notwendig, die ich in folgender Weise ausführte:

Das in bescheidener Menge frisch gesammelte Sekret wurde, um es von geformten Beimengungen und namentlich von dem reichlich vorhandenen Schleim zu befreien, anhaltend zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit filtriert und sofort wiederholt mit Essigsäure ausgeschüttelt. Die essigsaure Lösung wurde mit Wasser verdünnt, dann mit Chloroform geschüttelt. Mittels Scheidetrichters wurde die intensiv violette Chloroformlösung abgetrennt, behufs Neutralisation der überschüssigen Essigsäure mit Magnesiumcarbonat versetzt, nach einigem Stehen abfiltriert, zuerst auf dem Wasserbade eingeengt, dann im Vakuum mehrere Tage stehen gelassen. Der trockene, zum Teil kristallinische Rückstand war intensiv blau. Ein kleiner Teil davon ließ, im Platintiegel geglüht, einen Rückstand, der, in Salzsäure gelöst, mit Ferrocyankalium und Rhodanammonium starke Eisenreaktionen gab. Auch die Stickstoffprobe von Lasseigne fiel stark positiv aus. Neben Stickstoff und Eisen scheint eine Spur Mangan vorhanden zu sein. Es ist dies nach dem Auftreten der charakteristischen Grünfärbung beim Schmelzen mit Soda und Salpeter auf einem Porzellanscherben zu vermuten. Ich behalte mir vor, diesen Befund nachzuprüfen und auch die Elementaranalyse auszuführen, sobald ich neuerlich genügend Material gesammelt habe, was in der gegenwärtigen Jahreszeit wegen der Schwierigkeit, die untersuchte Aplysiaspezies zu erhalten, nicht mehr möglich ist.

Literatur.

A. und E. Negri, Delle materie coloranti delle Aplysie. Atti della R. Università di Genova 3, 11—25 (1875).

Collinge, Secretion of a violet coloured fluid by certains of the Limnacidae. The Zoologist [3] 9, 309.

R. Saint-Loup, Compt. rend. de la Soc. d. Biol. 42, 116 (1890).

G. Mazzarelli, Ricerche sulla morfologia e fisiologia delle glandole de Bohatsch nelle Aplysidae. Atti Accad. Napoli, Serie seconda 4 (1891).

Mac Munn, The pigments of Aplysia punctata. Journ. of Physiol. 24, 1 (1899).

Kürzere Mitteilungen.

1. Über den giftigen Bestandteil des Harns bei Eklampsie.

Von Dr. **M. Savarè** (Florenz).

(Aus der gynäkologisch-geburtshilflichen Klinik in Florenz [Direktor Prof. G. Resinelli].)

In einer vorhergehenden Arbeit[1]) habe ich mitgeteilt, daß der nichtdialysable Rückstand des Harns von Eklamptischen auffällig vermehrt ist und auch gegenüber der Norm abweichende Eigenschaften aufweist. Ich habe seitdem Gelegenheit gehabt, eine größere Zahl von Eklampsiefällen (15) zu untersuchen, und teile meine Befunde hier in Kürze mit, wenngleich die chemische Untersuchung selbst nur einen geringen Fortschritt aufzuweisen hat.

In allen Fällen von Eklampsie habe ich konstant die Vermehrung des nicht dialysablen Rückstandes nachweisen können, und zwar entsprach diese der Schwere der Erkrankung. Den höchsten Gehalt daran, 13,84 g pro Liter, beobachtete ich bei einer Frau, die dem eklamptischen Anfalle erlag.

Die Menge des Rückstandes nahm stets nach Ausbleiben der Anfälle rasch ab, so daß sie vier bis fünf Tage später zur Norm zurückgekehrt war. Eine Ausnahme von dieser Regel bildete ein Fall, wo der hohe Gehalt an nichtdialysablen Stoffen nach Ausbleiben der Anfälle zunächst fast unverändert blieb; in diesem Falle traten aber bemerkenswerterweise fünf Tage später neuerlich Anfälle auf.

Die Untersuchung des Rückstandes im Tierversuch ergab eine hohe Giftigkeit, die, wie K. Sasaki[2]) und Pons[3]) gezeigt haben, dem nichtdialysablen Rückstande des normalen Harns fehlt. Da es sich bei dem toxischen Rückstande nicht um eine einheitliche Substanz, sondern um ein Gemenge von Stoffen handelt, können genaue Angaben über die Toxizität nicht gemacht werden. Doch waren bei intravenöser Injektion schon Dosen von 0,06 g für Kaninchen im Gewicht von etwa 1500 g tödlich. Die Tiere verfielen in einen soporösen Zustand, dann in klonisch-tonische Krämpfe von wechselnder Dauer, es folgte Paralyse der hinteren Körperhälfte, heftige Dyspnoe, Mydriase, Koma. Manch-

---

[1]) Diese Beiträge 9, 401.
[2]) Ebenda 9, 386.
[3]) Ebenda 9, 393.

mal wiederholten sich die Krampfanfälle, bis der Tod unter Erscheinungen von Asphyxie eintrat. Der Verlauf der Vergiftung währte etwa 2 bis 12 Stunden. In den nicht tödlichen Fällen erfolgte die Erholung nur langsam. Die Autopsie ergab zahlreiche Ekchymosen in Pleura, Pericard und Endocard, kleine parenchymatöse Hämorrhagien in Thymus, Leber und Nieren.

Bei der chemischen Untersuchung bot der Rückstand die qualitativen Reaktionen von Proteïden; bei der Spaltung mit Säuren lieferte er, aber nicht konstant, Purinbasen. Man könnte somit dem üblichen Sprachgebrauch nach die toxische Substanz den Toxalbuminen zuzählen, womit freilich über ihre chemische Natur sehr wenig ausgesagt ist.

Über die Beziehung des toxischen im Harn auftretenden Körpers zum eklamptischen Anfall, speziell, ob sein Auftreten *Ursache* oder *Folge* der Anfälle ist, gestatten die Beobachtungen noch kein endgültiges Urteil. Immerhin sprechen zwei Beobachtungen, wo die Vermehrung der nichtdialysablen Substanzen dem Ausbruch der Anfälle *voranging*, ferner der im Tierversuch hervortretende Parallelismus zwischen Schwere der Erkrankung und Giftigkeit des Rückstandes, endlich aber auch die Ähnlichkeit der Vergiftungserscheinungen mit den Symptomen der Eklampsie für eine *ursächliche* Beziehung.

---

2. Über das Nucleoproteïd der Placenta.

Von Dr. M. Savarè (Florenz).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg i. E.)

Über das Nucleoproteïd der Placenta liegen nur wenige und nicht sehr eingebende Untersuchungen vor.

Cocchi[1]) isolierte aus dem wässerigen Auszuge der Placenta nach dem Verfahren von Wooldridge eine durch verdünnte Essigsäure fällbare Substanz, die Eiweißreaktionen darbot und bei der Verdauung einen phosphorhaltigen Rückstand gab. Aus diesem Verhalten bzw. aus dem Nachweis von Nucleïnsäure und Purinbasen schloß er, daß es sich um ein Nucleoproteïd handelt.

Acconci[2]) gelangte bei Extraktion mit Sodalösung zu ähnlichen Ergebnissen, ebenso Bottazzi und Delfino[3]), die zur Extraktion Fluornatriumlösung benutzten. Intravenöse Injektion der Nucleoproteïdlösung führte unter Auftreten ausgebreiteter Gerinnungen im Herzen und den großen Gefäßen den Tod herbei, wie dies auch für Nucleoproteïde anderer Organe bekannt ist.

Diese spärlichen Erfahrungen berechtigen kaum zu weitgehenden Schlüssen auf die funktionelle Bedeutung des Nucleoproteïds, wenn man auch im Hinblick auf seine Abstammung aus den Placentarzellen, die für den Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind so wichtig sind, diese Bedeutung nicht niedrig einschätzen darf.

Meine Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf die Darstellung und Zusammensetzung des Nucleoproteïds. In dieser Richtung liegen nur Phosphor- und Stickstoffbestimmungen vor, deren Wert dadurch geschmälert wird, daß keine genügende Gewähr für die Einheitlichkeit und konstante Zusammensetzung des analysierten Materials vorliegt. Es geht dies aus der ungenügenden Übereinstimmung der Analysenzahlen hervor. Cocchis Phosphorwerte (0,734 und 1,839 Proz.) differieren sehr erheblich. Acconci findet 1,35 und 1,09 Proz. und ver-

---

[1]) A. Cocchi, Sopra il nucleoproteide della placenta umana. Lo Sperimentale, anno LV. fasc. 4. 1901.

[2]) G. Acconci, Il nucleoproteide della placenta umana. Sue proprietà chimiche e biologiche. Annali di Ostetricia e Ginecologia. Giugno 1904.

[3]) F. Bottazzi e A. Delfino, Ricerche sulla composizione chimica della placenta muliebre. Bollettino della R. accadem. medica di Genova. Nr. XVIII.

mutet, daß die Substanz Mucin enthält, soweit dieses in 5 proz. Salzsäure löslich ist, da er beobachtete, daß die Substanz nach Spaltung mit Säure Kupferoxyd reduzierte.

Die Aussicht, das Nucleoproteïd der Placenta in sicher reinem Zustande zu gewinnen, ist natürlich verschwindend gering. Was sich zurzeit unter günstigen Bedingungen erzielen läßt, ist allenfalls die Darstellung von Präparaten, die in Zusammensetzung und Eigenschaften übereinstimmen und so einen Vergleich mit Nucleoproteïden anderer Organe gestatten.

Darstellung: Die von Membranen befreiten Placenten wurden fein zerhackt, mit destilliertem Wasser gewaschen, bis die breiige Masse blaßrosa war, und die Waschflüssigkeit nur schwach blutige Färbung aufwies. Der Brei wurde jetzt 24 Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung stehen gelassen, der Rückstand vom Extrakt durch Kolieren getrennt, nun noch einmal mit 5 proz. und dann so oft mit 10 proz. Kochsalzlösung ausgezogen, bis weitere Auszüge keinen Niederschlag mehr mit Essigsäure gaben.

Aus den Extrakten wurde das Nucleoproteïd durch Essigsäure in graulichen Flocken gefällt, die im ersten Auszug minder reichlich auftraten als im dritten. Der Niederschlag wurde durch wiederholtes Lösen in ammoniakhaltigem Wasser gelöst und durch Fällen mit Essigsäure gereinigt.

Die erhaltene Substanz zeigte folgende Eigenschaften:

Sie ist unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther und verdünnten Säuren, äußerst löslich in schwachem Alkali, speziell in Ammoniak, daraus durch verdünnte Säuren fällbar. Der durch 5 proz. Salzsäure erzeugte Niederschlag löst sich zum Teil im Überschuß des Fällungsmittels.

Die Substanz wird durch Metallsalze gefällt. Sie gibt Millonsche, Adamkiewiczsche, Xanthoproteïn- und Biuretreaktion. Bei der Trommerschen Probe kommt es zu sehr geringer Abscheidung von Kupferoxydul, aber nicht mehr nach Behandlung mit 10 proz. Schwefelsäure. Nach mehrstündigem Erhitzen mit 5 proz. Salzsäure gibt die Lösung, mit Ammoniak neutralisiert und mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt, einen feinflockigen weißen Niederschlag.

Behufs Analyse wurde die Substanz nach dem Trocknen und Pulverisieren im Soxhletapparat mit Alkohol, Äther und Chloroform ausgezogen, bis die Extrakte keinen Phosphor mehr enthielten.

Die wiederholte Analyse der so gereinigten und bei 100° getrockneten Substanz ergab (nach Abzug der Asche) die Zusammensetzung:

$$C = 50 \text{ Proz.}, \ H = 7{,}3 \text{ Proz.}, \ N = 15 \text{ Proz.}, \ S = 1 \text{ Proz.}, \ P = 0{,}45 \text{ Proz.}$$

Vergleicht man die Werte mit den von Cocchi und Acconci erhaltenen, so fällt vor allem die Differenz im Phosphorgehalt ins Auge, der bei Cocchi ein Maximum von 1,84 Proz. erreicht. Andererseits gibt Acconci den Stickstoffgehalt zu 12,88 Proz. an. Bedenkt man, daß diese Autoren ihre Präparate keiner andauernden Extraktion mit Alkohol und Äther usw. unterworfen haben, so liegt die Vermutung nahe, daß ihre abweichenden Zahlen durch die Anwesenheit phosphorreicher, aber stickstoffarmer Beimengungen (Lecithine und andere

Lipoide) beeinflußt sind. Der von mir gefundene niedrige Phosphorgehalt entspricht dem geringen Gehalt an Purinbasen.

Betreffs des durch Reduktion nachweisbaren Kohlehydrats gelang es mir, nach Aufspaltung mit Säuren die Anwesenheit von Pentosen reaktionell mit Orcin und Phloroglucin, und spektroskopisch sicherzustellen. Um die Natur der abspaltbaren Purinbasen zu ermitteln, zersetzte ich 20 g der Substanz durch 10 proz. kochende Schwefelsäure. Die Verarbeitung gestaltete sich wegen der geringen Mengen der Basen recht unbefriedigend. Das Produkt gab schließlich die Xanthinreaktion.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Placenta ein Nucleoproteïd enthält, das in seiner Zusammensetzung, namentlich in seinem geringen Phosphorgehalt eine gewisse Analogie mit jenem der Milchdrüse aufweist. Da Placenta und Milchdrüse der Ernährung des kindlichen Organismus dienen, kann an die Möglichkeit gedacht werden, daß beide Nucleoproteïde eine ähnliche funktionelle Bedeutung haben. Doch besitzen wir über die physiologische Rolle der Nucleoproteïde zu wenig gesicherte Beobachtungen, um im vorliegenden Falle zu weitergehenden Schlüssen berechtigt zu sein.

3. Zur Charakteristik der Guanylsäure.

Von **Ivar Bang** (Lund).

In einer jüngst erschienenen Studie über die chemische Stellung der Pankreasnucleïnsäure[1]) teilen v. Fürth und Jerusalem Beobachtungen mit, welche nach ihrer Meinung beweisen, daß die von mir eingehend studierte Guanylsäure anders zusammengesetzt sei und andere Spaltungsprodukte liefere, als ich angegeben habe. Sie soll danach im Gegensatz zu meinen Befunden einerseits weder eine Pentose- noch eine Glyceringruppe, andererseits aber nicht allein Guanin, sondern auch Adenin und vermutlich auch Pyrimidinbasen enthalten. v. Fürth und Jerusalem kommen zu dem Schlusse, „es dürfte sich empfehlen, die Bezeichnung Guanylsäure, als auf einer irrigen Annahme basierend, ganz fallen zu lassen".

Diese Schlußfolgerung der Verfasser wäre gewiß berechtigt, wenn die Argumente, auf die sie sich stützen, zutreffend wären. Wie wenig das jedoch der Fall ist, dürfte aus folgendem hervorgehen.

Für eine Nachprüfung meiner Angaben wäre wohl billigerweise am Platze gewesen, daß sich v. Fürth und Jerusalem eines nach meiner Vorschrift dargestellten, durch Analyse und Eigenschaften als Guanylsäure identifizierten Präparates bedient hätten. Dieser Forderung entsprechen jedoch ihre Versuche nur zum Teil.

Die Zusammensetzung und der Pentosengehalt der Guanylsäure werden von ihnen auf Grund von Nucleïnsäurepräparaten beurteilt, die sie mit Hilfe einer Kombination des Neumannschen Verfahrens mit einer Kupfermethode dargestellt haben. Nun enthält das Pankreas, wie bekannt, neben Guanin noch andere Purinbasen, und da diese ausschließlich oder hauptsächlich als Bestandteile von Nucleïnsäuren aufzutreten pflegen, so ist von vornherein zu erwarten, daß das Pankreas neben der bloß Guanin enthaltenden Guanylsäure noch andere Nucleïnsäuren enthält, wie sie ja in der Tat von Levene u. a. beschrieben worden sind[2]). Wenn nun v. Fürth und Jerusalem für die von ihnen nach einem ganz abweichenden Verfahren dargestellte Pankreasnucleïnsäure eine andere Zusammensetzung finden als ich für die Guanylsäure, bzw. in ihr die Pentose vermissen, so beweist das zwar, daß ihr Präparat keine Guanylsäure war, berechtigt aber zu keinem Urteil über

---

[1]) Diese Beiträge **10**, 174.

[2]) Siehe auch Hammarstens Lehrbuch, 6. Aufl., S. 382: „Außer diesem Proteïd (welches die Guanylsäure liefert) muß im Pankreas mindestens noch eines enthalten sein, welches die Muttersubstanz der aus Pankreas erhältlichen Thymusnucleïnsäure ist."

die Richtigkeit meiner auf Guanylsäure, und nur auf diese, bezüglichen Angaben.

Auch ist die von den Verfassern hervorgehobene Eventualität, daß man durch „Reinigungsmittel“ die Pentose von der Guanylsäure entfernen und in dieser Weise zu der „reinen“ Pankreasnucleïnsäure gelangen könne, ausgeschlossen. Da die Guanylsäure 30 Proz. Pentose, 18 Proz. N und 8 Proz. P enthält, müßte man in diesem Falle zu einem Körper mit etwa 25,7 Proz. N und etwa 11,4 Proz. P kommen, was keiner bis jetzt bekannten Nucleïnsäure entspricht.

Etwas anders liegt die Sache in betreff des Basen- und Glyceringehaltes. Bei den einschlägigen Versuchen haben sich v. Fürth und Jerusalem eines α-Guanylsäurepräparats bedient, das nach dem von mir und Raaschou angegebenen Verfahren dargestellt war. Bei der Bestimmung der Purinbasen fanden sie nicht bloß Guanin, sondern auch Adenin und überdies ein erhebliches Stickstoffdefizit, welches „vermutlich auf Pyrimidinbasen zu beziehen ist“. In einem Versuche erhielten sie aus 1,1249 g Guanylsäure 0,074 g Guanin und 0,043 g Adenin (Mittelwert!), so daß von 0,204 g Stickstoff nur 0,063 g auf Purinbasen, 0,141 g auf die vermuteten Pyrimidinbasen entfallen!

Dieser auffällige, meinen Erfahrungen durchaus widersprechende Befund — der übrigens auch mit der Vorstellung der Verfasser über den Aufbau der Pankreasnucleïnsäure unvereinbar ist, indem diese Säure dann 5 Moleküle Pyrimidinbasen auf 1 Molekül Purinbasen enthalten müßte — dürfte seine Erklärung in der angewandten Methodik finden. v. Fürth und Jerusalem benutzten zur Bestimmung der Purinbasen das Verfahren von Burian und Hall. Nun ist dieses Verfahren für die Untersuchung der an Purinbasen nur etwa 0,1 Proz. enthaltenden Organextrakte bestimmt, und es ist durchaus nicht ausgemacht, daß es auch bei der Spaltung der Nucleïnsäuren, und gar solcher mit einem Basengehalt von 35 Proz., anwendbar ist. Hierzu kommt, daß v. Fürth und Jerusalem bei der Ausführung des Verfahrens Barytwasser bis zum Eintritt alkalischer Reaktion hinzugefügt haben, während Burian und Hall vorschreiben, daß die Flüssigkeit mit fein gepulvertem Baryt stark alkalisch gemacht werden soll, da bei ungenügender Alkaleszenz ein Verlust an Basen zu befürchten sei. Welche Bedeutung diesem Umstande zukommt, läßt sich aus nachstehendem Kontrollversuch entnehmen.

1,1249 g Guanylsäure enthalten etwa 0,39 g Guanin; da die Verfasser zur Hydrolyse 20 ccm 1 proz. Schwefelsäure verwendeten, betrug die Guaninkonzentration nach der Hydrolyse etwa 2 Proz. Ich stellte mir nun mit Hilfe von 1 g Guaninum muriat. eine 1,5 proz. Lösung von Guanin in 5 ccm 1 proz. Schwefelsäure her, machte die ganz heiße Lösung mit gesättigtem Barytwasser (14 ccm) alkalisch, filtrierte und wusch den Rückstand dreimal mit kochendem Wasser (75 ccm) aus. Filtrat und Waschwasser lieferten, mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, nur 0,049 g trockenen Silberniederschlag, entsprechend etwa 0,03 g Guanin. Nicht weniger als 96 Proz. Guanin waren somit im ausgewaschenen Niederschlag zurückgeblieben.

Dementsprechend ließen sich daraus mit verdünnter Salpetersäure große Mengen Guanin ausziehen.

Es liegt sonach die Möglichkeit vor, daß v. Fürth und Jerusalem bei ihrer Guaninbestimmung mit einem sehr großen Verlust gearbeitet haben, woraus sich auch das beobachtete Stickstoffdefizit erklären würde.

Ebenso angreifbar ist die Versuchsanordnung, mit der die Verfasser das Adenin im Guaninfiltrat bestimmen. Sie gehen dabei von der Vorstellung aus, daß das Guanin durch Ammoniak quantitativ gefällt wird, und sehen den der Fällung entgangenen Anteil, soweit er durch ammoniakalisches Silbernitrat niedergeschlagen wird, schlechtweg für Adenin an. Nun lösen aber nach Wulff[1]) 100 ccm verdünnten Ammoniaks von 1,3, bzw. 5 Proz. NH_3 nicht zu vernachlässigende Mengen, 9,15 bzw. 19 mg Guanin. Es darf also der der Ammoniakfällung entgangene Anteil der Purinbasen nicht ohne nähere Untersuchung als Adenin angesprochen werden. Wie notwendig eine solche nähere Untersuchung ist, geht aus den in meiner ersten Abhandlung[2]) mitgeteilten Versuchen hervor, in denen das Filtrat der Ammoniakfällung nach neuerlicher Ausfällung mit Silber wiederholt neue Mengen durch Reaktionen und Ammoniakfällbarkeit nachweisbaren Guanins lieferte, und schließlich die Menge des höchstenfalls vorhandenen Adenins auf Spuren reduziert erschien.

Den Nachweis des Glycerins unter den Spaltungsprodukten der Guanylsäure habe ich seinerzeit mit den damals als zuverlässig geltenden Reaktionen, namentlich mit der empfindlichen Acroleïnprobe geführt und den positiven Ausfall durch Sachverständige kontrollieren lassen. Wenn nun v. Fürth und Jerusalem mit Hilfe des Methoxylverfahrens zu einem negativen Ergebnis gelangen, so steht Beobachtung gegen Beobachtung, und ich gebe zu, daß eine Nachprüfung meiner in diesem Falle nur durch qualitative Versuche gestützten Beobachtung wünschenswert erscheint.

Ich habe die Untersuchung der Guanylsäure nach Verbesserung der Darstellungsmethode wieder aufgenommen und behalte mir einschlägige Mitteilungen vor. Indes ist die Anwesenheit der Glyceringruppe für die Stellung der Guanylsäure in der Reihe der Nucleïnsäuren nicht von ausschlaggebender Bedeutung. Hier ist vor allem die Natur der vorhandenen Basen maßgebend, und da ich nach dieser Richtung meine Angaben durchaus nicht als widerlegt ansehen kann, muß ich die von mir gewählte Bezeichnung „Guanylsäure" als völlig zutreffend aufrecht halten.

Da die Darstellungsmethode der α-Guanylsäure jedenfalls bei unvorsichtiger Arbeit leicht zu Verunreinigungen mit anderen Nucleïnsäuren führt, habe ich mich bemüht, ein neues, bequemes und zuverlässiges Verfahren auszuarbeiten. Zur selben Zeit habe ich die ganze Frage der Guanylsäure revidiert und werde demnächst darüber berichten.

Lund Medio, September 1907.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 17, 505. (Vgl. auch Hammarstens Lehrbuch, S. 161.)

[2]) Ebenda 26, 151 ff.

4. Über das Urochrom.

Von Dr. chem. **Ottorino Bocchi.**

(Aus dem Institut für Pathologie zu Parma.)

Wie ich und Dr. Ghelfi gezeigt haben [1]), zeigen Harne, bei denen die Diazoreaktion beobachtet wird, mit basischem Bleiacetat versetzt, eine charakteristische gelbgrünliche Färbung des Filtrats. Diese ist nicht von Urochrom abhängig, sondern von einer gut charakterisierten Substanz, welche wir Chromoxyproteïnsäure genannt haben. Daß diese Substanz nicht mit Urochrom verunreinigt ist, zeigt neben anderem die nachstehende Arbeit.

Es ist mir gelungen, eine neue Methode zur Darstellung des sogenannten Urochroms aufzufinden, die zu einer reineren Substanz führt als das Verfahren von Garrod.

Der Harn wird mit Ammonsulfat gesättigt, nach zwölfstündigem Stehen abfiltriert und aus dem Filtrat der Farbstoff mit absolutem Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung wird in viel Wasser gegossen, mit Ammonsulfat gesättigt, die abgeschiedene Pigmentlösung mit dem Scheidetrichter abgetrennt und — nach Zusatz von etwas festem Ammonsulfat — im Vakuum bei höchstens 25° verdampft. Dieselbe Operation wiederholt man mit der im Scheidetrichter nach einiger Zeit sich wieder abscheidenden Pigmentlösung. Der Rückstand wird mit absolutem Alkohol aufgenommen, eingeengt, dann in Wasser gelöst und nach Zugabe einiger Tropfen sehr verdünnter Essigsäure mit basischem Bleiacetat ausgefällt. Der Niederschlag wird auf dem Filter mit viel Wasser durch Dekantieren wiederholt gewaschen, dann mit einer 20 proz. Na_2HPO_4-Lösung durch tüchtiges Umschütteln während einiger Minuten zerlegt. Die Mischung wird in absoluten Alkohol gegossen, filtriert und das Filtrat mit viel Wasser verdünnt, mit Ammonsulfat gesättigt und wie vordem behandelt. Endlich nimmt man den Rückstand mit Alkohol auf und fällt mit dem doppelten Volumen Äther.

Man erhält rotbräunliche Flocken, die sich allmählich absetzen.

---

[1]) Atti del 14. Congr. di Med. Int. Roma 1904. — Sulla natura della sostanza che produce la diazoreazione nelle urine. Il Tommasi, Anno II, No. 5 und ibid. No. 15 (1907).

Die so erhaltene Substanz, mit Alkohol gut gewaschen, stellt eine amorphe rotbraune Masse dar, die alle Eigenschaften des sogenannten Urochroms hat. Sie unterscheidet sich aber von dem sonst erhältlichen Produkt dadurch, daß sie indikan- und harnstofffrei ist und von basischem Bleiacetat vollkommen gefällt wird.

Die letztere Eigenschaft zeigt, daß unsere Chromoxyproteïnsäure nicht mit Urochrom verunreinigt ist. Die Resultate der Analyse des Urochroms und seiner Kupfer- und Silbersalze — von mir in einigermaßen reinem Zustande erhalten —, sowie einige Untersuchungen über das Urochrom in den Fäces behalte ich mir für eine spätere Mitteilung vor.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter
Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben
von

Franz Hofmeister
o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

XI. Band 3. und 4. Heft
(Ausgegeben Dezember 1907)

Braunschweig
Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn
1908

Inhalt des 3. und 4. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie" erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge" soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen" kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

V.

Über die enzymatische Wirksamkeit des nicht mehr in den Darm sezernierenden Pankreas.

Von Dr. **Ugo Lombroso**, Assistent.

(Aus dem physiologischen Institut der Königlichen Universität Rom. Direktor Prof. L. Luciani.)

Durch eine lange Reihe von Versuchen habe ich gezeigt, daß das Pankreas sich nach Unterbindung und Durchschneidung der Ausführungsgänge bei Kaninchen und Hund sehr verschieden verhält[1]).

Beim Kaninchen verschwindet nach der Unterbindung des Wirsungschen Ganges (den Nebengang bei diesem Tiere zu fassen, ist wegen seiner Zartheit unmöglich) das ganze normale Drüsenparenchym. Es bleiben nur die sogenannten „Langerhansschen Zellhaufen" mit ihren eigentümlichen Merkmalen und die Drüsengänge durch lange Zeit erhalten und es wird eine Anzahl von Schläuchen, bestehend aus nicht recht bestimmbaren Zellen, beobachtet, die meiner Ansicht nach veränderte Acini darstellen. Die Zeit, die notwendig ist, um das Pankreas in diesen Zustand überzuführen, ist ziemlich kurz (20 bis 30 Tage). Bei längerer Beobachtungsdauer werden Unterschiede beobachtet, welche jedoch nicht bloß einen Fortschritt dieses Umwandlungsprozesses darstellen; so habe ich bei einem vor 110 Tagen operierten Falle eine größere Anzahl jener nicht recht bestimmbaren Zellen und der Langerhansschen Zellhaufen beobachtet, als bei einem anderen, bei dem vom Eingriff ab nur 40 Tage verstrichen waren.

Beim Hunde bietet das Pankreas nach der Unterbindung und Durchschneidung beider Ausführungsgänge keine der beim

---

[1]) Ugo Lombroso, Journal de Physiologie et de Pathologie génerale 1905, p. 3. Sur la structure histologique du pancreas après ligature et section des conduits pancreatiques. — Derselbe, Archivio di Fisiologia 1906, p. 205. Sugli elementi che partecipano alla funzione interna del pancreas.

Kaninchen beobachteten morphologischen Veränderungen. Nicht bloß bleiben die Langerhansschen Zellhaufen, sondern auch das Drüsenparenchym vollkommen erhalten [1]).

Was ferner den Einfluß dieses Eingriffes auf die Vorgänge des Stoffwechsels anbelangt, so hatte ich beobachtet, daß die Glykosurie bei allen diesen Tieren fehlt.

Die Nährstoffresorption zeigt sich fast unverändert beim Kaninchen und nur wenig verändert beim Hunde.

Viele andere Forscher haben vor mir die Struktur des Pankreas beim Hunde und beim Kaninchen nach einem derartigen Eingriffe untersucht und somit das verschiedene Verhalten des Drüsenparenchyms beobachtet, und doch hat niemand daran Zweifel laut werden lassen, daß das Paradigma der auf den Duktusverschluß beim Hunde folgenden Veränderungen das vom Kaninchen dargebotene sei. Dem Fortbestande der Drüsenacini beim Hunde wurde keine größere Bedeutung beigemessen, und um diese Tatsache ohne Widerspruch mit den beim Kaninchen erhaltenen Ergebnissen zu erklären, wurden mehr oder minder beweiskräftige Gründe angeführt, ja es wurde diese Erscheinung sogar dazu benutzt, die Unzulässigkeit des Eingriffes am Hunde zu beweisen. Mit dieser Behauptung, die von verschiedenen Forschern hypothetisch, sei es durch das Vikarieren des Nebenduktus (wofern dieser beim Eingriff nicht reseziert worden war), sei es durch das Wiederdurchgängigwerden (!) der Hauptduktus, sei es endlich durch die Annahme einer Duktusneubildung, gestützt wurde, habe ich mich in meinen früheren Arbeiten beschäftigt. In nachstehender Arbeit werde ich, um diesen Vermutungen aus dem Wege zu gehen, in jedem Fall das Verfahren angeben, das ich bei den Eingriffen am Pankreas anwendete.

Ziehe ich jetzt die Gründe in Betracht, durch die man den Fortbestand der Acini im Hundepankreas, ohne die Wirksamkeit des Eingriffes zu bezweifeln, hat erklären wollen, so behauptet einmal

---

[1]) In jüngster Zeit hat Hess (Die Ausführungsgänge des Hundepankreas, Pflügers Arch. **118**, 536 und Exper. Beitr. z. Anatomie und Pathologie des Pankreas, Med.-naturw. Arch. **1**, Heft 1) gezeigt, daß in einer gewissen Anzahl von Fällen das Hundepankreas drei Ausführungsgänge haben kann. Er behauptet, nach Unterbindung aller drei Duktus andere Resultate als ich erhalten zu haben. Auf die Arbeiten von Hess werde ich bald eingehender zu sprechen kommen; vorläufig sei nur bemerkt, daß in betreff der Pankreasstruktur kein wesentlicher Unterschied zwischen seinen und meinen Ergebnissen besteht; er wendet nur das Wort „Sklerose“ für das an, was ich „Bindegewebsneubildung“ nenne, und zwar deshalb so nenne, weil, wie ja auch er beobachtet hat, dabei noch Drüsenacini unversehrt erhalten bleiben.

Mouret[1]) (1895), das viel größere Hundepankreas brauche eine viel längere Zeit als das Kaninchenpankreas, um atrophisch zu werden. Nun kenne ich keine Tatsache, die für diese Behauptung sprechen könnte; sie wird dagegen durch viele experimentelle Beobachtungen widerlegt. So ist für die Speicheldrüsen[2]) beobachtet worden, daß die auf Unterbindung und Durchschneidung der Ausführungsgänge folgende Atrophie sowohl bei großen oder kleinen Hunden, als bei Kaninchen ungefähr zu derselben Zeit auftritt. Diese kleinen Drüsen werden ferner viel langsamer atrophisch als die größten Drüsen des Körpers, Leber und Nieren, nach Unterbindung und Durchschneidung ihrer Duktus. Es braucht also die Unzulänglichkeit der Erklärung, die Mouret für das Fortbestehen der Pankreasacini beim Hunde gegeben hat, nicht weiter bewiesen zu werden.

Nach der Abelmann-Pflügerschen[3]) Hypothese wird ferner angenommen, das Hundepankreas mit den unterbundenen Ausführungsgängen setze die Bildung seines Sekretes fort, nur werde dieses resorbiert. Es wird Gegenstand einer nächsten Mitteilung sein, die Beobachtungen auszuführen, durch welche ich zur Verwerfung dieser Hypothese gelangt bin; manche der sie stützenden Gründe habe ich bereits durch einige schon veröffentlichte Untersuchungen[4]) widerlegen können. Wenn aber auch diese Hypothese sich bewährt hätte, so wäre damit die Frage des verschiedenen Verhaltens des Drüsenparenchyms bei Hund und Kaninchen nur verschoben, nicht aber entschieden worden; denn dann hätte untersucht werden müssen, warum nicht aus demselben Grunde auch das Drüsenparenchym des Kaninchens erhalten bleibt.

Bei dem nun, was in der experimentellen Physiopathologie bekannt ist über die Beziehungen, die zwischen morphologischem und funktionellem Zustande eines Organs bestehen, scheint mir die Vermutung nicht zu gewagt, daß den in verschiedenen Zustand geratenen Drüsen eine verschiedene Funktion zukommen könne. Ich habe beim Hunde ermitteln können, welche Störungen infolge der Exzision des Pankreas nach Duktusunterbindung und -durch-

---

[1]) Mouret, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1895, p. 201. De la sclerose des greffes du pancreas chez le chien.

[2]) Marzocchi, Archivio di Scienze Mediche 1904.

[3]) Ed. Pflüger, Arch. f. d. ges. Physiologie **108**, 123 (1905): „Ein Beitrag zur Frage nach dem Ursprung des im Pankreasdiabetes ausgeschiedenen Zuckers".

[4]) Ugo Lombroso, Arch. f. d. ges. Physiologie **112**, 531 (1906): „Über die Beziehungen zwischen der Nährstoffresorption und den enzymatischen Verhältnissen im Verdauungskanal".

schneidung auftreten, und aus den Ergebnissen konnte ich einen Schluß auf die Funktion des so operierten Organs ziehen. Diesen Versuch habe ich aber beim Kaninchen nicht wiederholen können, weil hier die besonderen anatomischen Verhältnisse die Pankreasexstirpation nicht zulassen.

Da ich also beim Kaninchen meine Untersuchung in dieser Weise nicht weiterführen konnte, hielt ich es für geraten, einen anderen Weg einzuschlagen, um in die Bedeutung der bei diesen zwei Tieren nach dem gleichen Eingriffe gefundenen morphologischen Unterschiede im Pankreas Einblick zu gewinnen.

Ich habe dabei meine Aufmerksamkeit auf die Enzymwirkungen des Pankreas gelenkt und festzustellen gesucht, ob sich diese entsprechend den morphologischen Verhältnissen verändern.

Im nachstehenden teile ich das Ergebnis von zahlreichen einschlägigen Bestimmungen mit, die ich sowohl an Kaninchen als an Hunden systematisch und in verschiedenen Zeiträumen nach Unterbindung und Durchschneidung der Ausführungsgänge ausgeführt habe.

Obwohl, soweit mir bekannt, eine solche Untersuchung noch nicht von anderen vorgenommen worden ist, findet man doch in der ausgedehnten Pankreasliteratur einige Beobachtungen, die zu ihr in gewisser Beziehung zu stehen scheinen. So hat, was das Kaninchen betrifft, Pawlow[1]) nach Beschreibung der auf die Unterbindung des Wirsungschen Duktus folgenden morphologischen Veränderungen sich die Frage gestellt, was für eine enzymatische Wirksamkeit das seit so langer Zeit im erweiterten Duktus stauende Sekret haben könnte. Ein anderer Forscher, Tiberti[2]), suchte die Leistungsfähigkeit des Kaninchenpankreas mit unterbundenem Ausführungsgange mit Hilfe einer sehr originellen Methode zu ermitteln, indem er das Verhalten der Körnchen systematisch in verschiedenen Zeiträumen nach dem Eingriff verfolgte. Ich werde auf die Ergebnisse Tibertis im folgenden zurückkommen, weil der Vergleich mit den von mir erzielten Resultaten von Interesse ist. Schließlich findet man einen Hinweis auf die enzymatische Wirksamkeit des Kaninchenpankreas nach Unterbindung des Ausführungsganges bei Pende[3]), welcher eine solche noch nach einem Monat gefunden zu haben angibt.

---

[1]) Pawlow, Pflügers Arch. 16 (1892). Folgen der Unterbindung des Pankreasganges bei Kaninchen.

[2]) Tiberti, Lo Sperimentale 1902. Sulle minute alterazioni del pancreas consecutive alla legatura del condotto di Wirsung.

[3]) Pende, Il Tommasi No. 8, 1907 und Lo Sperimentale No. 5, 1905. Contributo alla fisiopatologia del pancreas.

Einer gewissen Schwierigkeit bin ich bei der Wahl des Verfahrens begegnet, nach der ich mein Versuchsmaterial bereiten sollte. Bis vor wenigen Jahren wurde die Wirksamkeit der Verdauungsdrüsen an Auszügen geprüft, die in der Weise künstlich hergestellt wurden, daß aus dem Drüsenbrei Fermentlösungen mittels Glycerin oder physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, eventuell auch weiter gereinigt wurden. Dieses zu qualitativen Versuchen bei verschiedenen Drüsen ausreichende Verfahren kommt jetzt für feinere quantitative Untersuchungen nicht mehr in Betracht. Für diese zieht man die natürlichen Sekrete vor. Doch konnten diese in meinem Falle wegen der Bedingungen der Untersuchung natürlich nicht in Betracht kommen. Ich benutzte daher ein rasch ausführbares Verfahren zur Bereitung einer Art künstlichen Sekrets, das zugleich eine genügende Anzahl von Bestimmungen ermöglichte.

Bei Kaninchen erfolgte die Entnahme des Pankreas gleich nach Tötung des Tieres durch Verblutenlassen. Bei Hunden verfuhr ich manchmal ebenso, meist aber wurde das Pankreas hier dem lebenden oder spontan verendeten Tiere entnommen. Das Pankreas wurde gewogen, hierauf in der Reibschale mit Glaspulver und Thymol verrieben und der Brei mit zwei Teilen 1 proz. Kochsalzlösung zu einer gleichmäßigen Emulsion verdünnt. Durch zahlreiche Beobachtungen konnte ich mich überzeugen, daß dieses Verfahren ziemlich gut untereinander vergleichbare Resultate liefert, allerdings unter der Bedingung, daß die Pankreasemulsion auf die zu untersuchende Substanz hinreichend lange einwirken konnte[1]).

A. Versuche mit Kaninchenpankreas nach Unterbindung des Wirsungschen Ganges.

Ich habe die amylo- und lipolytische[2]) Wirksamkeit des Pankreas von neun Kaninchen in Zeitabständen von 36 Stunden bis 90 Tagen nach Unterbindung und Durchschneidung des Wirsungschen Ganges und von zwei normalen Kaninchen untersucht.

Die amylolytische Wirksamkeit wurde bestimmt nach der Zuckermenge, die sich in einer halben Stunde im Brutschranke bei 40° aus einer bestimmten Menge Stärkekleister (1 g Weizenstärke mit 30 ccm destillierten Wassers gekocht) durch die Wirkung von ½ ccm der Pankreasemulsion bildete. Die

---

[1]) Ich habe gelegentlich anderer Untersuchungen eine große Anzahl von Bestimmungen über die Fermentwirkung echten Pankreassaftes machen können. Einer der wichtigsten Unterschiede beider Verfahren besteht darin, daß bei Anwendung echten Pankreassaftes viel rascher ein Gleichgewichtszustand eintritt als mit Pankreasemulsion.

[2]) Die ebenfalls ausgeführte Untersuchung der proteolytischen Wirksamkeit stellt, da Kinase hinzugefügt werden muß, ein zu kompliziertes Verfahren dar, als daß es hier möglich wäre, darüber kurz zu berichten.

Bestimmung der Zuckermenge geschah nach Fehlings Methode. Die lipolytische Wirksamkeit wurde dadurch bestimmt, daß 1 ccm Emulsion mit 5 ccm Mandelöl durch drei bis sechs Stunden im Brutschranke bei 40° stehen gelassen und der Fettsäuregehalt durch Titration ermittelt wurde. Zur Hebung der Wirksamkeit des Sekretes wurde 1 ccm Galle hinzugefügt. Als Indikator diente Phenolphtaleïn.

I. Pankreas eines normalen, erwachsenen Kaninchens.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet aus 1 g Weizenstärke bei obiger Versuchsanordnung in $^1/_2$ Stunde im Brutschranke bei 40° 68 cg Zucker (Mittel aus zwei Bestimmungen).

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Kaninchengalle + 5 ccm reines Mandelöl im Brutschranke bei 40° bedurften zur Neutralisation der Fettsäuren:

nach 3 Stunden	14 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH	gesättigt
„ 6 „ weitere	4,5 „ „	„
„ 16 „ „	2,2 „ „	„
Zusammen =	20,7 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH	

1 ccm Pankreasemulsion + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach 6 Stunden 5,5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

II. Pankreas eines normalen Kaninchens mittlerer Größe.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet, wie oben behandelt, aus 1 g Weizenstärke in $^1/_2$ Stunde 60,5 cg Zucker (Mittel aus zwei Bestimmungen).

III. 2,400 kg schweres Kaninchen, 36 Stunden nach Unterbindung und Durchschneidung des Wirsungschen Ganges.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet aus 1 g Weizenstärke: 36,8 cg Zucker, (Mittel aus zwei Bestimmungen).

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Galle (von der Gallenblase desselben Kaninchens[1]) + 5 ccm Mandelöl:

nach 3 Stunden gebildete Fettsäuren entsprechend	9,4 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH
nach 6 Stunden weitere	2,9 „ „
Zusammen:	12,3 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

IV. 2,100 kg schweres Kaninchen, vier Tage nach Unterbindung und Durchschneidung des Wirsungschen Ganges.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet, wie oben geprüft: 28,1 cg Zucker (Mittel aus zwei Bestimmungen).

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Galle (von demselben Tiere) + 5 ccm Mandelöl:

nach 3 Stunden im Brutschranke Fettsäuren	6,2 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH
„ 6 „ weitere	0,8 „ „
Zusammen:	7,0 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

[1]) Die Galle der schon operierten Kaninchen besitzt keine lipolytische Wirksamkeit, wie ich bereits beim Hunde nach einem solchen Eingriff beobachtet habe. Da ich ferner bemerkt habe, daß auf das lipolytische Pankreasenzym die Galle verschiedener Tiere verschieden einwirken kann, so gebe ich Fall für Fall an, von welchem Tiere die angewendete Galle stammte.

V. 2,200 kg schweres Kaninchen, neun Tage nach Unterbindung und Durchschneidung des Wirsungschen Ganges.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet, wie oben geprüft: 14 cg Zucker (Mittel aus zwei Bestimmungen).

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Galle (von demselben Tiere) + 5 ccm Mandelöl benötigen:

nach 3 Stunden	. . . .	3,8 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH
„ 6 „ weitere	. . . . . .	1,4 „ „
	Zusammen:	5,2 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

VI. 2,350 kg schweres Kaninchen, 14 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet, wie oben geprüft: 60 cg Zucker (Mittel aus zwei Bestimmungen).

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Galle (von demselben Tiere) + 5 ccm Mandelöl. Nach 3 Stunden Fettsäuren 1,5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

1 ccm Pankreasemulsion + 2 ccm Rindergalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach 6 Stunden 2,8 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

VII. 3,050 kg schweres Kaninchen, 19 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet, wie oben geprüft: 5,2 cg Zucker (Mittel aus zwei Bestimmungen).

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Galle (von demselben Tiere) + 5 ccm Mandelöl verbrauchen nach 3 Stunden 1 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH, nach 6 Stunden weitere 2 Tropfen $^1/_{10}$ n-NaOH.

VIII. 2,200 kg schweres Kaninchen, 28 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet, wie oben behandelt, nach einer halben Stunde nicht bestimmbare Spuren Zucker (eine Bestimmung); nach drei Stunden im Brutschranke 2,5 cg.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Galle (von demselben Tiere) + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach 6 Stunden 0,6 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

IX. 1,900 kg schweres Kaninchen, 35 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet, wie oben behandelt, in einer halben Stunde 13 cg Zucker (eine Bestimmung); nach 3 Stunden 35 cg (eine Bestimmung).

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Galle (von demselben Tiere) + 5 ccm Mandelöl verbrauchen nach 6 Stunden 0,8 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

In diesem Falle bemerkt man, besonders in bezug auf die Amylolyse, eine größere Wirksamkeit als in den zwei vorhergehenden Versuchen. Beachtenswerterweise war aber eben in diesem Falle eine größere Menge von Epithelelementen (Zellhaufen, Schläuche und Gänge), wenn auch verändert, nachweisbar.

X. 2,500 kg schweres Kaninchen, 54 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet, wie oben behandelt, in einer halben Stunde keinen Zucker; nach 6 Stunden finden sich unbestimmbare, ganz geringe Spuren.

2 ccm Pankreasemulsion bilden aus 1 g Weizenstärke (in 30 ccm destilliertem Wasser gekocht) in 6 Stunden unbestimmbare Spuren Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Hundsgalle (die Gallenblase des Kaninchens wurde vollkommen leer gefunden) + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach 6 Stunden 1,2 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

XI. 2,900 kg schweres Kaninchen, 90 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

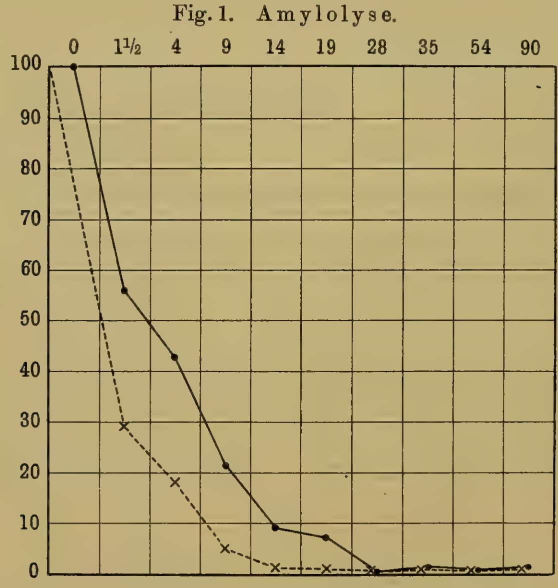
$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion bildet, wie oben behandelt, in einer halben Stunde keinen Zucker.

2 ccm Pankreasemulsion bilden aus 1 g Weizenstärke in 6 Stunden unbestimmbare Spuren Zucker.

2 ccm Pankreasemulsion bilden aus 1 g Weizenstärke in 24 Stunden 4 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Galle (von demselben Tiere) + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach 6 Stunden 1,6 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

Fig. 1. Amylolyse.

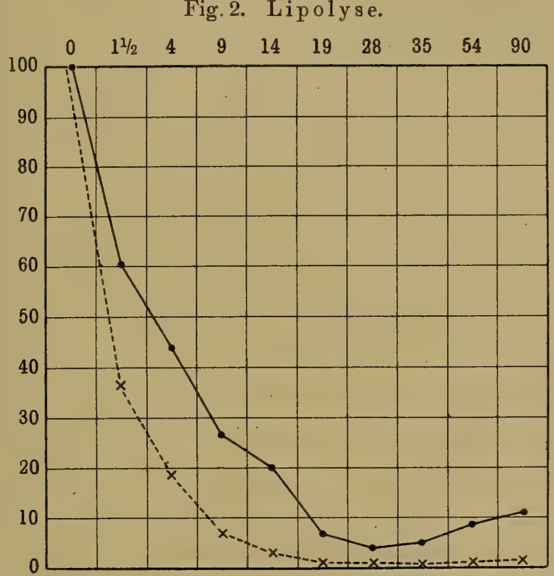


---- Enzymatische Wirksamkeit, nach dem Schützschen Gesetz berechnet.
—— Enzymatische Wirksamkeit in Prozenten.

In vorstehendem Schema stelle ich graphisch die Zahlen der enzymatischen Tätigkeit des Kaninchenpankreas dar, gegenüber den Werten, denen sie nach dem Schützschen Gesetze entsprechen.

Die Ergebnisse der mitgeteilten Versuche zeigen, daß nach der Unterbindung und Durchschneidung des Wirsungschen Ganges beim Kaninchen eine rasche und starke Abnahme der enzymatischen Tätigkeit des Pankreas eintritt. In einer verhältnismäßig kurzen Zeit (14 bis 19 Tage) ist diese so herabgesetzt, daß sie bei weitem nicht mehr mit derjenigen der normalen Drüse verglichen werden kann (weniger als $^1/_{100}$ derselben nach der Schütz-Borissowschen Regel!). In einer vom Eingriff noch weiter abstehenden Zeit wird diese Wirksamkeit noch geringer, so daß sie nur als ein Überbleibsel der normalen, ähnlich der fast allen Geweben eigenen Wirksamkeit angesehen werden kann.

Fig. 2. Lipolyse.



---- Enzymatische Wirksamkeit, nach dem Schützschen Gesetz berechnet.
——— Enzymatische Wirksamkeit in Prozenten.

Die Abnahme der enzymatischen Tätigkeit ist eine allmähliche. In einigen Fällen wurde eine gewisse Abweichung von dieser Erscheinung beobachtet, jedoch in so geringem Maße, daß dies in die Fehlergrenze der angewandten Bestimmungsmethode fällt; jedenfalls wird dadurch die Erscheinung in ihrem Wesen nicht beeinträchtigt.

Wir haben oben erwähnt, daß Tiberti[1]) die Leistungsfähigkeit des Kaninchenpankreas nach Unterbindung des Wirsungschen

---

[1]) Tiberti, Lo Sperimentale, l. c.

Ganges zu untersuchen unternommen hatte. Dieser Forscher behauptet, daß in den ersten Tagen eine Anhäufung der sogenannten Zymogenkörnchen, hierauf allmählicher Schwund der alten und endlich nach einer gewissen Zeit (30 bis 40 Tagen) Bildung von neuen, auch in bezug auf ihren Zymogenkörnchengehalt vollkommen normalen Drüsenschläuchen erfolgt.

Nimmt man die von Tiberti gegebene Beschreibung im wesentlichen an, und vergleicht man die von ihm betreffs der Zymogenkörnchen erzielten Ergebnisse mit demjenigen, was wir in bezug auf die Enzymwirkung des Pankreas beobachtet haben, so sieht man, daß die Abnahme der letzteren von dem Gehalt an Zymogenkörnchen unabhängig ist. Tatsächlich haben wir eine Abnahme der Enzymwirkung auch in der Zeit (36 bis 60 Stunden) gesehen, in der die Körnchen abnehmen sollen, und eine gewisse Wirksamkeit zu einer Zeit, in der sie vollständig geschwunden sind; schließlich haben wir die Abwesenheit der Enzymwirkung zu einer Zeit beobachtet, in der nach Tiberti die Körnchen wiedererscheinen.

Diese Beobachtungen können vielleicht zur Beantwortung der schon von vielen erörterten und noch strittigen Frage über die Bedeutung der Zymogenkörnchen beitragen. Obgleich die Mehrzahl der Forscher dazu neigt, sie als Anhäufungen von Profermenten anzusehen, bezweifelt Laguesse, der in diesem Gegenstande so kompetente Forscher, auf Grund eigener Untersuchungen diese Deutung. Laguesse[1]) schreibt: . . . „nous tendons à croire, qu'il faut seulement modifier ou préciser l'acception actuelle du mot, et entendre pour grain de zymogène, non pas, à proprement parler, un préstade de la trypsine, mais une substance albumoide spéciale, capable seulement à donner naissance à la longue (par une sorte de fermentation probablement) et par petites quantités longtemps renouvables, à une trypsine très active sous un faible volume.“

Wenn aber auch meine Untersuchungen gezeigt haben, daß das Sekret des Kaninchenpankreas eine gewisse Zeit nach der Unterbindung und Durchschneidung des Ausführungsganges keine der äußeren enzymatischen Eigenschaften besitzt (außer auf die Amylase und Lipase habe ich auch auf die Trypsinase usw. geprüft), so kann man ihm doch noch nicht alle enzymatische Tätigkeit absprechen. Man darf nämlich nicht vergessen, daß nach

---

[1]) Laguesse, Le Pancreas. Lyon 1906.

einigen Autoren [Laguesse[1]), Diamare[2]), Lépine[3]) u. a.] die innere Funktion des Pankreas sich durch eine innere Sekretion ausdrücken soll; man könnte also vermuten, daß die Körnchen unter diesen Verhältnissen die Zymogene darstellen, welche bei der inneren Funktion in Tätigkeit treten.

B. Versuche mit Hundepankreas nach Unterbindung und Durchschneidung der Ausführungsgänge.

Über die enzymatische Tätigkeit des nicht mehr in den Darm sezernierenden Hundepankreas sind schon Versuche angestellt worden; doch waren sie höchst einfach und hatten einen von dem unsrigen ganz verschiedenen Zweck. Man wollte nämlich dabei bloß ermitteln, ob unter die Haut transplantierte oder nach Ausschneidung des Pankreas in der Bauchhöhle zurückgebliebene Pankreasstücke noch funktionsfähig blieben. Dazu genügte die qualitative Bestimmung der Fermentwirkung. Tiroloix[4]), Hédon[5]), Minkowski[6]) u. a. führten derartige Versuche aus, ohne vorher festzustellen, ob das in Frage stehende Pankreasstück noch Sekret abscheiden konnte oder nicht. Nun gingen aber diese Forscher eben bloß auf die Ermittelung der Frage nach der Funktionsfähigkeit der Pankreasstücke aus[7]), und konnten feststellen, daß wenigstens qualitativ die enzymatischen Eigenschaften erhalten blieben.

Ich habe in der angegebenen Weise die amylolytische und lipolytische Wirksamkeit des Pankreas von sieben Hunden nach Unterbindung und Durchschneidung beider Duktus und bei vier Hunden die Wirksamkeit des zwischen den Peritonealblättern jenseits vom Hauptduktus und an dem dem Pylorus entgegengesetzten Ende gelegenen freien und beweglichen Pankreasanteils nach Verpflanzung unter die Bauchhaut untersucht.

---

[1]) Laguesse, Le Pancreas. Lyon 1906.

[2]) Diamare, Journal international d'Anatomie VII, 1899. Studi comparativi sulle insule del Langerhans del Pancreas.

[3]) Lépine, Semaine medicale, 2. Decembre 1903. De la Glycolyse dans ses rapports avec le diabète.

[4]) Tiroloix, Arch. de Phys. 1892, p. 716.

[5]) Hédon, Arch. de médicine experimentale 1893, p. 695.

[6]) O. Minkowski, Untersuchungen über den Diabetes mellitus. Leipzig 1893, S. 35.

[7]) Diese Untersuchung stellt eine der Grundlagen dar, auf die sich die Lehre von einer inneren Funktion des Pankreas stützt; solange das Pankreasstück erhalten blieb, trat kein Diabetes auf. Dieser hing also nicht mit der äußeren, sondern mit der anderen Pankreasfunktion zusammen.

I. Normaler Hund, 7,900 kg schwer.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben geprüft, bildete 58 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Hundegalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 33 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

II. Hund, 8,400 kg schwer, 40 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben geprüft, bildete 39 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Hundegalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 24,5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

III. 9,300 kg schwerer Hund, 14 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben geprüft, bildete 21 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Hundegalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke bei 40° 36 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

IV. 6,200 kg schwerer Hund, 28 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben geprüft, bildete 48 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Rindergalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 39 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

V. 11,200 kg schwerer Hund, 36 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben geprüft, bildete 27 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Hundsgalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 17 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

VI. 4,900 kg schwerer Hund, 57 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben geprüft, bildete 19 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Rindergalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 26 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

VII. 7,200 kg schwerer Hund, 65 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben geprüft, bildete 38 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Hundsgalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 18 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

VIII. 6,900 kg schwerer Hund, 68 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben geprüft, bildete 23 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Rindergalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 23 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

Aus den über die enzymatische Tätigkeit des Hundepankreas verschiedene Zeit nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus angestellten Versuchen geht hervor:

1. Daß bestimmte enzymatische Eigenschaften in einigen Fällen allerdings, in anderen aber sehr wenig abnehmen.

2. Daß die Abnahme (soweit überhaupt eine solche bei der Breite der Fehlergrenzen des Verfahrens behauptet werden kann) nicht im Zusammenhange steht mit der seit dem Eingriffe verstrichenen Zeit.

Auch in dieser Beziehung besteht also ein fundamentaler Unterschied zwischen dem Verhalten des Hunde- und des Kaninchenpankreas gegenüber der Ausschaltung der äußeren Sekretion. Beim Hunde tritt nicht jene Abnahme der enzymatischen Eigenschaften ein, die man beim Kaninchen findet, und welche die normale Wirksamkeit rasch auf ein Zehntel, Hundertstel, Tausendstel der Norm (nach der Schützschen Regel berechnet) herabsetzt.

Ich führe jetzt die Versuche an, die ich nach Verpflanzung des Hundepankreas unter die Bauchhaut angestellt habe. Ich erinnere dabei an den Umstand, daß man in diesen Fällen ein sehr sonderbares Verhalten des histologischen Baues beobachtet hat[1]), und daß bei diesem Eingriffe andere Ursachen außer der Stauung des Sekretes auf das Organ einen Einfluß ausüben können, vor allem die Ernährungsstörung, da es fast unmöglich ist, die Blutgefäße vollkommen zu schonen.

IX. 5,200 kg schwerer Hund, 14 Tage nach Exstirpation von $^3/_4$ des Pankreas und Verpflanzung des anderen Viertels unter die Bauchhaut spontan verendet. Das Pankreas ist auf einen Bindegewebshaufen mit wenigen, veränderten Epithelelementen der Duktus reduziert.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben mit Kleister aus 1 g Weizenstärke geprüft, bildete in einer halben Stunde im Brutschranke unbestimmbare Spuren Zucker.

Auch nach 3 Stunden waren nur unbestimmbare Spuren Zucker nachweisbar.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Hundsgalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke bei 40° 1,2 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

X. 7,800 kg schwerer Hund. Das Pankreas wurde vor 30 Tagen unter die Bauchhaut verpflanzt und wird jetzt dem lebenden Tiere exstirpiert. Histologisch wohl erhalten.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, in obiger Weise geprüft, bildete 29 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Rindergalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 24 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

XI. 7,300 kg schwerer Hund, 38 Tage nach der Pankreasverpflanzung spontan gestorben.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, in obiger Weise geprüft, bildete 19 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Hundsgalle + 5 ccm Mandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 8,5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

---

[1]) U. Lombroso, Sulla Funzione del Pancreas nel ricambio materiale. Torino, Tipografia Sacerdoti 1906, p. 76.

XII. 6,850 kg schwerer Hund. Pankreas seit 32 Tagen verpflanzt. Dem lebenden Tiere exstirpiert.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, wie oben geprüft, bildete 22 cg Zucker.

1 ccm Pankreasemulsion + 1 ccm Rindergalle + 5 ccm Süßmandelöl verbrauchten nach einer Stunde im Brutschranke 14 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

C. Versuche am Pankreas von Tauben nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus.

An dieser Stelle halte ich es für zweckmäßig, der Beschreibung der mit Hunde- und Kaninchenpankreas angestellten Versuche diejenigen Experimente folgen zu lassen, welche ich in ähnlicher Weise am Pankreas von Tauben angestellt habe. Diese Versuche scheinen mir sehr überzeugend und geeignet, den zwischen den morphologischen Verhältnissen und der enzymatischen Wirksamkeit dieser Drüse bestehenden Zusammenhang noch deutlicher hervortreten zu lassen.

Bevor ich aber zur Beschreibung der Versuche selbst schreite, will ich erwähnen, daß an dieser Drüse angestellte histologische Untersuchungen mir die sonderbare Erscheinung gezeigt haben, daß die Drüsenacini zuerst durch den zeitweisen Verlust ihrer normalen Struktur (10 bis 14 Tage lang) eine tiefgreifende Veränderung aufwiesen, dann aber nach und nach alle ihre normalen, spezifischen Merkmale zurückgewannen [1]).

Es ist hier wohl nicht am Platze, auf diese Erscheinung sowie auf ihre Bedeutung hinsichtlich der verschiedenen Theorien über die innere Pankreasfunktion näher einzugehen, da ich schon öfters darüber berichtet habe und nächstens eine Zusammenfassung dieser Untersuchungen zu geben gedenke.

Die zahlreichen Bestimmungen der enzymatischen Wirksamkeit des Taubenpankreas wurden sowohl nach Unterbindung und Durchschneidung der zwei vorderen oder des hinteren Pankreasduktus (die operierten wurden von den erhalten gebliebenen selbstverständlich getrennt), als auch nach gleichzeitiger Unterbindung und Durchschneidung aller drei Duktus gemacht. Wenn man in letzterer Art verfährt, stirbt das Tier (im Gegensatz zu dem, was beim Hund und beim Kaninchen beobachtet wurde [2]) an Kachexie inner-

---

1) Ugo Lombroso, Journal de Physiologie e de Pathologie generale 1905. L. c.

2) Derselbe, Rendiconti della R. Accademia dei Lincei 1907, p. 214. Sulla possibile sopravivenza dei colombi alla legatura e recisione dei tre dotti pancreatici.

halb der nächsten 10 bis 18 Tage (Beobachtung an acht Tieren gemacht). Das ist schon von Langendorff beobachtet und einzig der durch Ausfall des Sekretes bedingten mangelhaften Resorption zugeschrieben worden. Ich habe allerdings beobachtet, daß die Nahrungsresorption nach diesem Eingriff verändert ist, habe aber in der letzten Zeit nachweisen können, daß dies nicht ausschließlich vom Fehlen des Sekretes im Darm abhängig ist. Denn ich habe alle drei Pankreasduktus der Taube unterbinden und durchschneiden können, ohne daß die so operierten Tiere zugrunde gingen, wenn ich die verschiedenen Duktus in zwei Zeiten unterband, so daß die zuerst angegriffenen Läppchen Zeit hatten, sich neu zu bilden[1]. Dazu bedurfte es ungefähr zweier Monate. Wenn ich den zweiten Eingriff früher (nach einem oder anderthalb Monaten) unternahm, oder wenn irgend ein entzündlicher Prozeß die zuerst operierte Portion schwer befallen hatte, so starben die Tauben ungefähr in der gleichen Zeit, wie nach gleichzeitiger Unterbindung aller Duktus. Es konnte kaum ein schlagenderer Beweis dafür erbracht werden, daß die als Ursache des Todes angesehene Resorptionsstörung nicht allein dem Fehlen der äußeren Sekretion zuzuschreiben ist, daß vielmehr diese Erscheinungen zu der veränderten inneren Sekretion der Acini in Beziehung stehen, die in den ersten Wochen nach dem Eingriffe tief verändert sind.

Über die unter letztangeführten Bedingungen beobachtete Enzymwirkung berichte ich in dieser Arbeit nicht, da die Untersuchung noch fortgesetzt wird. Ich teile dagegen die Ergebnisse von Versuchen an sechs Tauben mit, welche nach der Unterbindung und Durchschneidung der drei Duktus spontan zugrunde gingen, und ferner Beobachtungen an zehn Tauben, die verschieden lange Zeit nach der Unterbindung und Durchschneidung der beiden vorderen Duktus zerstört wurden; dabei dienten die Ergebnisse eines Versuches an einem nicht operierten Taubenpankreas zum Vergleiche. Die Bestimmung habe ich sowohl für die lipo- als für die amylolytische Wirkung der Pankreasemulsionen in der gewöhnlichen Weise ausgeführt; dabei fiel mir der Umstand auf, daß sowohl am nicht operierten als am operierten Pankreas in der großen Mehrzahl der Fälle keine stärkere als die vielen anderen Organen zukommende Lipolyse nachzuweisen war. Ich berichte vorläufig nur über die Ergebnisse der Untersuchung betreffend die amylolytische Wirkung.

---

[1]) Näheres sowohl über diese Erscheinung als über den Stoffwechsel bei diesen Tieren wird demnächst mitgeteilt werden.

I. 325 g schwere, normale Taube.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, in obiger Weise geprüft, bildete 38 cg Zucker (Mittel aus zwei Bestimmungen).

II. 420 g schwere, normale Taube.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, in obiger Weise geprüft, bildete 34 cg Zucker (Mittel aus zwei Bestimmungen).

III. 380 g schwere Taube, 14 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der drei Duktus gestorben (200 g schwer).

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, in obiger Weise geprüft, bildete unbestimmbare Spuren Zucker.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, in obiger Weise geprüft, aber 6 Stunden im Brutschranke, bildete 4 cg Zucker.

IV. 395 g schwere Taube, 16 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der drei Duktus gestorben (190 g schwer).

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, in obiger Weise geprüft, eine halbe Stunde im Brutschranke, bildete unbestimmbare Mengen Zucker.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, ebenso, aber 6 Stunden im Brutschranke, bildete unbestimmbare Spuren Zucker.

V. 415 g schwere Taube, 11 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der drei Duktus gestorben (230 g schwer).

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, in obiger Weise geprüft, eine halbe Stunde im Brutschranke, bildete 2 cg Zucker.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, ebenso geprüft, aber 6 Stunden im Brutschrank, bildete 7 cg Zucker.

VI. 370 g schwere Taube, 14 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der drei Duktus gestorben (190 g schwer).

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, in obiger Weise geprüft, eine halbe Stunde im Brutschranke, bildete unbestimmbare Mengen Zucker.

$^1/_2$ ccm Pankreasemulsion, ebenso geprüft, aber 6 Stunden im Brutschrank, bildete 3 cg Zucker.

VII. 400 g schwere Taube, 3 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der zwei vorderen Duktus.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem vorderen Pankreasteil, wie oben geprüft, bildete 21 cg Zucker.

Dasselbe mit Emulsion aus dem hinteren Pankreasteil bildete 30 cg Zucker.

VIII. 390 g schwere Taube, 5 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der zwei vorderen Duktus.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem vorderen Pankreasteil, wie oben geprüft, bildete 16 cg Zucker.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem hinteren Pankreasstück bildete 32 cg Zucker.

IX. 440 g schwere Taube, 8 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der zwei vorderen Duktus.

1 ccm Emulsion aus dem vorderen Pankreasstück, wie oben geprüft, bildete 13 cg Zucker[1]).

1 ccm Emulsion aus dem hinteren Pankreasteil bildete 29 cg Zucker.

X. 365 g schwere Taube, 13 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der vorderen zwei Duktus.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem vorderen Pankreasteil, wie oben geprüft, bildete 6 cg Zucker.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem hinteren Pankreasteil bildete 32 cg Zucker.

XI. 315 g schwere Taube, 18 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der vorderen zwei Duktus.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem vorderen Pankreasstück, wie oben geprüft, bildete 15 cg Zucker.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem hinteren Pankreasteil bildete 37 cg Zucker.

XII. 370 g schwere Taube, 25 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der vorderen zwei Duktus.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem vorderen Pankreasteil, wie oben geprüft, bildete 23 cg Zucker.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem hinteren Pankreasteil bildete 28 cg Zucker.

XIII. 375 g schwere Taube, 46 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der vorderen zwei Duktus.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem vorderen Pankreasteil, wie oben geprüft, bildete 34 cg Zucker.

Die Bestimmung der diastatischen Wirksamkeit des hinteren Pankreasteiles wurde nicht ausgeführt.

XIV. 320 g schwere Taube, 75 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der vorderen zwei Duktus.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem vorderen Pankreasteil, wie oben geprüft, bildete 32 cg Zucker.

$^1/_2$ ccm Emulsion aus dem hinteren Pankreasteil bildete 29 cg Zucker.

In zwei weiteren Fällen zeigte sich der vordere Pankreasteil 35 bzw. 50 Tage nach Unterbindung und Durchschneidung der zwei vorderen Duktus jeder diastatischen Wirksamkeit bar. In diesen zwei Fällen war bei der histologischen Untersuchung eine erhebliche kleinzellige Infiltration und bindegewebige Neubildung nachweisbar. Die Drüse war vollkommen verändert.

Umstehendes Schema stellt graphisch die Zahlen der enzymatischen Tätigkeit des Taubenpankreas dar, gegenüber den Werten, denen sie nach dem Schütz-Borissowschen Gesetze entsprechen.

Aus dieser Untersuchung geht also folgendes hervor:

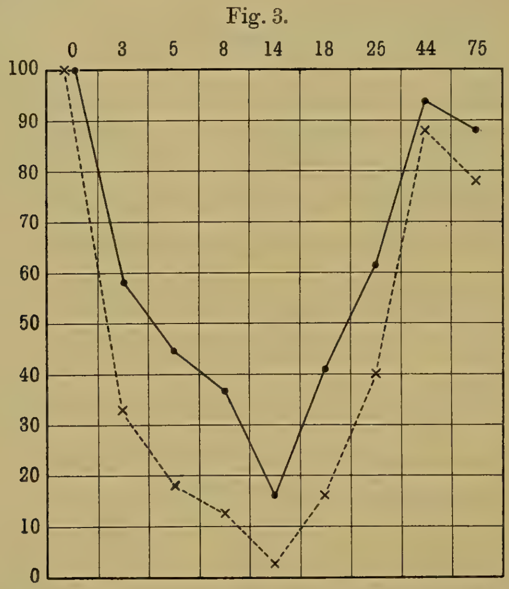
---

[1]) Mit Bezug auf die Diskussion der den Zymogenkörnchen zuzuschreibenden Bedeutung ist die ziemlich erhebliche diastatische Tätigkeit dieses Pankreas bemerkenswert, da ich an ihm keine Erhaltung der Cl. Bernardschen Körnchen beobachtete.

1. Vergleicht man das Pankreas von spontan nach Unterbindung und Durchschneidung aller drei Duktus verendeten Tauben mit einem nur zum Teil operierten und zum anderen Teil noch funktionierenden Pankreas, so bemerkt man in ersterem Falle eine viel stärkere Abnahme der enzymatischen Wirksamkeit[1]).

2. Die enzymatische Tätigkeit eines Pankreaslappens der Taube mit unterbundenem und durchschnittenem Ausführungsgang nimmt für eine gewisse Zeit ab, um dann allmählich zur Norm zurückzukehren.

Fig. 3.



---- Enzymatische Wirksamkeit nach der Schütz-Borissowschen Regel berechnet.

—— Enzymatische Wirksamkeit in Prozenten.

In dem vom Eingriff nicht betroffenen Pankreasteil beobachtet man keine Zunahme der enzymatischen Wirksamkeit, und zwar auch nicht während des Zeitraumes, in dem die Tätigkeit des operierten Lappens am meisten herabgesetzt ist.

Vergleicht man nun die Versuche bei den drei Tierarten, an denen die Unterbindung und Durchschneidung der Pankreasduktus ausgeführt wurde, miteinander, so geht in bezug auf unsere Frage folgendes wichtige Ergebnis hervor:

---

[1]) Dabei darf nicht vergessen werden, daß in ersterem Falle das Tier stark marastisch zugrunde ging. Es sind also außer dem unmittelbaren Einfluß der Duktusobstruktion noch andere Faktoren mitbeteiligt.

Während beim Kaninchen nach Unterbindung und Durchschneidung der Duktus sich das allmähliche und endgültige Verschwinden der charakteristischen enzymatischen Eigenschaften einstellt, weicht beim Hunde und bei der Taube das Resultat insofern ab, als hier das Pankreas seine Wirksamkeit behält oder doch rasch wiedergewinnt.

Es besteht also bei diesen Tieren eine Beziehung zwischen dem nach dem Eingriff beobachteten Verlauf der histologischen Veränderungen und den Ergebnissen der Enzymversuche. Können wir nun annehmen, daß Organe, welche in bezug auf histologischen Bau und Eigenschaften ein so abweichendes Verhalten aufweisen, eine für den Organismus gleichwertige Funktion vollziehen?

Wir haben triftigen Grund dies auszuschließen, denn wir beobachten, daß sich beim Kaninchen einerseits nicht nur keine tiefgreifenden, sondern überhaupt keine bemerkbaren Stoffwechselstörungen einstellen, auch wenn die Drüse auf einen Bindegewebshaufen mit wenigen Langerhansschen Inseln und auf wenige Schläuche von veränderten Zellen reduziert ist, daß andererseits der Hund bei Veränderung der Drüsenacini mannigfaltige Stoffwechselstörungen aufweist und rasch zugrunde geht.

Einen noch deutlicheren Beweis für die verschiedene Funktionsfähigkeit der Drüse in ihren verschiedenen Zuständen finden wir bei der Taube.

Man nimmt, wie bekannt, an, daß nach Unterbindung der Ausführungsgänge keine Veränderungen der Langerhansschen Zellhaufen auftreten, da diese mit der Sekretausfuhr nicht nur ihrer Funktion nach, sondern auch anatomisch nicht in Beziehung stehen sollen.

Nun geht die Taube nach gleichzeitiger Unterbindung aller drei Duktus zugrunde, und zwar gerade in dem Zeitpunkte, in welchem die Acini nach dem, was uns bekannt ist, in bezug auf Bau und diastatische Tätigkeit den höchsten Grad der Veränderung erreichen. Dagegen kann dieses Tier am Leben bleiben, wenn wir durch den oben erwähnten Kunstgriff den Acinis gestatten, ihre normalen enzymatischen und morphologischen Eigenschaften zurückzugewinnen. Die unter diesen zwei verschiedenen Bedingungen von der Drüse geleistete Funktion ist also verschieden; da aber, wie gesagt, durch den Eingriff die Langerhansschen Zellhaufen nicht geschädigt sein sollen, so müssen wir unsere Aufmerksamkeit allein auf die Drüsenacini richten.

Wenn nun die von den operierten Drüsen geleistete Funktion bei verschiedenen Tieren eine verschiedene ist, so können wir unmöglich auf Grund der bei einer Tiergruppe nach Exstirpation der Drüse auftretenden Störungen einen Schluß auf die Folgen der Exstirpation bei einer anderen Tierart ziehen.

An dieser Behauptung ist mir deshalb besonders gelegen, weil die wichtigste sogenannte „experimentelle“ Tatsache, auf welcher die Annahme fußt, daß die innere Funktion des Pankreas von den Langerhansschen Zellhaufen abhänge, auf die Vermutung gegründet ist, daß nach Exstirpation des veränderten Kaninchenpankreas eben dieselben Störungen auftreten würden, wie nach der Pankreasexstirpation beim Hunde.

In einem nächsten Aufsatze, in welchem ich die von mir ausgeführten Versuche mitteilen werde, durch die ich ausschließe, daß die Acini des Hundepankreas mit unterbundenen und durchschnittenen Gängen fortfahren, ihr äußeres Sekret zu produzieren, werde ich auch auf die Bedeutung des Verharrens der Acini in ihrem dem normalen ähnlichen morphologischen und enzymatischen Verhalten und auf die Vermutungen, die sich an die Kenntnis ihrer inneren Funktion anschließen, ausführlicher zurückkommen.

VI.

Über die Einwirkung chemischer Substanzen auf die Zuckerausscheidung und die Acidose.

Zweite Mitteilung.

Von **Julius Baer** und **Léon Blum.**

(Aus der Medizinischen Klinik zu Straßburg [Geh. Med.-Rat Prof. Moritz]).

In einer früheren Arbeit[1]) stellten wir fest, daß subcutane Injektion von neutralem glutarsauren Natron bei hungernden Hunden mit schwerem Phlorizindiabetes starkes Absinken oder völliges Verschwinden der Glykosurie und der Acidose bei gleichzeitiger starker Verminderung der Stickstoffausscheidung hervorruft. Diese Wirkung trat um so deutlicher hervor, je schwerer der Diabetes war, fehlte dagegen bei leichten Glykosurien ohne Acidose, falls die Versuche nicht an „glykogenfreien" Tieren angestellt wurden. Es ergab sich aus diesen Tatsachen als nächstliegende Schlußfolgerung, daß die Glutarsäure nicht auf die Verbrennung vorgebildeten Zuckers, sondern auf die Entstehung von Zucker aus nicht kohlehydrathaltigem Material wirken muß.

Da die Wirkung der Säure zunächst nicht durch irgendwelche chemische Analogien gedeutet werden konnte, die stets bereite Annahme einer dunkeln fermentativen Wirkung aber nur als letzte Zuflucht betrachtet werden darf, wenn alle anderen Erklärungsmöglichkeiten und deren experimentelle Prüfung scheitern[2]), so haben wir versucht, durch Untersuchung von Homologen und

---

[1]) Über die Einwirkung chemischer Substanzen auf die Zuckerausscheidung und die Acidose. Diese Beiträge 10, 80.

[2]) Wir heben diesen Punkt besonders hervor, weil in neuerer Zeit versucht worden ist, Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels auf solche katalytische Wirkungen zurückzuführen (Schade, Katalyse und Diabetes. Münch. med. Wochenschr. 1907, S. 1862) und diese Hypothese Anklang gefunden hat. (Vgl. Noorden, Die Zuckerkrankheit usw., S. 251.)

Derivaten der Glutarsäure einen Einblick in die sich abspielenden chemischen Vorgänge zu gewinnen. Zunächst prüften wir den Einfluß der Homologen der Glutarsäure. In der erwähnten Arbeit haben wir bereits die Resultate von Versuchen mit Malonsäure, Bernsteinsäure und Methylbernsteinsäure mitgeteilt, die keinen der Glutarsäure ähnlichen Einfluß auf die Glykosurie und die Stickstoffausscheidung ergaben.

Im folgenden sollen zunächst die Befunde mitgeteilt werden, die wir bei Prüfung der höheren Homologen der Glutarsäure, der normalen Dicarbonsäuren mit 6, 7, 8, 9 und 10 C-Atomen, erhalten haben. Es sind dieses die Adipinsäure ($C^6H^{10}O^4$), die Pimelinsäure (C^7...), die Korksäure (C^8...), die Azelaïnsäure (C^9...) und die Sebacinsäure (C^{10}...).

Die Versuchsanordnung war genau die gleiche wie die früher von uns benutzte; die Menge der subcutan injizierten neutralen Natronsalze der Säuren betrug $^1/_2$ oder $^2/_3$ des $^1/_{10}$ Molekulargewichts in Gramm.

Das Ergebnis der Versuche war: Ähnlich wie die Glutarsäure, d. h. gleichzeitig auf die Acidose, Glykosurie und die Stickstoffausscheidung wirken die Adipinsäure, die Pimelinsäure und die Korksäure, also die Säuren C^6..., C^7... und C^8... Sie scheinen sich demnach ähnlich wie die Glutarsäure im intermediären Stoffwechsel zu verhalten. Dagegen fehlt der Azelaïnsäure (C^9...) und der Sebacinsäure (C^{10}) jeder Einfluß auf die Zucker- und Stickstoffausscheidung, die Säuren zeigen jedoch eine deutliche Wirkung auf die Acidose.

In dem Einfluß der wirksamen Säuren bestehen gewisse graduelle Unterschiede. Am stärksten wirkt die Glutarsäure, es folgen die Adipinsäure und die Pimelinsäure, die keinen sicheren Unterschied untereinander erkennen lassen; am schwächsten scheint die Korksäure zu wirken, soweit sich derartige Schlüsse aus Versuchen an verschiedenen Tieren ziehen lassen. Vielleicht spielt hierbei auch die gleich zu besprechende verschiedene Verbrennbarkeit der einzelnen Säuren eine Rolle.

In Analogie mit dem Verhalten mancher Verbindungen im Organismus lag die Vermutung nahe, daß die höheren Säuren schlechter verbrannt werden als die niedrigen, und daß die Unwirksamkeit der Azelaïnsäure und der Sebacinsäure auf ihrer mangelhaften Verbrennbarkeit im Tierkörper beruht. Wir haben von diesem Gesichtspunkte aus die Mengen der Säuren festgestellt, die am Versuchstage im Urin wieder ausgeschieden wurden. Für

die Malonsäure und die Glutarsäure ist bekannt, daß nach Eingabe per os nur ein sehr kleiner Teil im Harn wieder erscheint. Bernsteinsäure konnte unter den gleichen Versuchsbedingungen nicht im Harn nachgewiesen werden [1]). Nach subcutaner Injektion dieser Säuren haben wir Malonsäure und Glutarsäure nicht in deutlicher Menge im Ätherextrakt des Harns nachweisen können, dagegen Bernsteinsäure in geringer Menge. Von den höheren Säuren konnten jedoch größere Quantitäten mit Leichtigkeit aus dem Harn isoliert werden. Am besten wird die Adipinsäure verbrannt, von 7,1 g wurden im Harn 0,85 g wiedergefunden. Viel schlechter wurden die anderen Homologen oxydiert. Von 10,6 g Pimelinsäure erschienen im Harn 5 g, von je 8,8 g Korksäure 5,4 und 4,94 g, von je 9,4 g Azelaïnsäure 4,74 und 4,76 g, von je 10,1 g Sebacinsäure 4,56 g und 1,38 g [2]).

Da bei der Ausscheidung nach der subcutanen Einverleibung die Resorptionsverhältnisse eine große Rolle spielen, können natürlich an den späteren Tagen noch weitere Mengen der Säuren ausgeschieden worden sein; außerdem geben unsere Zahlen, da sie an verschiedenen Tieren gewonnen worden sind, nicht direkt vergleichbare Werte für die Verbrennbarkeit der einzelnen Säuren. Es geht aber doch aus denselben mit großer Wahrscheinlichkeit hervor, daß die Pimelinsäure und die Korksäure, vor allem die letztere, nicht besser verbrannt werden als die beiden höheren Säuren, die Azelaïnsäure und die Sebacinsäure, sondern eher schlechter. Die Wirkung der Säuren kann daher nicht ausschließlich von ihrer Verbrennbarkeit im Tierkörper abhängen. Am wahrscheinlichsten scheint es uns, daß für die höheren, nicht wirksamen Säuren ein anderer Abbaumodus Platz greift.

Eine ausführliche Besprechung der Wirkungsart der untersuchten Säuren werden wir bei Mitteilung weiterer Versuche über die Derivate der Glutarsäure bringen.

Zum Schlusse haben wir noch einen Versuch mit Benzoësäure beigefügt, zu dessen Ausführung uns eine briefliche Mitteilung von Herrn Privatdozent Dr. Mohr in Berlin veranlaßt hat. Um einen Beweis für die Entstehung von Zucker aus Eiweiß und dessen Spaltungsprodukten beim Pankreasdiabetes zu erbringen, injizierte

---

[1]) P. Marfori, Über Veränderungen einiger Säuren der Oxalsäurereihe durch den Organismus. Ann. chim. farm. 23, 193, zitiert nach Malys Jahresbericht 26, 74.

[2]) Die Ursache dieses auffallend geringen Wertes im zweiten Sebacinsäureversuche konnten wir nicht feststellen.

Mohr[1]) hungernden pankreaslosen Hunden 6 bis 7 g benzoësaures Natron subcutan und konnte danach eine Verminderung der Zuckerausscheidung feststellen unter gleichzeitiger starker Vermehrung der Stickstoffausscheidung. Das Resultat unseres Versuches — ein zweiter, in dem der Hund infolge der Benzoësäuredarreichung 12 Stunden vor Beendigung des letzten Versuchstages starb, verlief ebenso — zeigt, daß der Benzoësäure eine Wirkung auf die Zuckerausscheidung und die Acidose nach Art der Glutarsäure nicht zukommt.

Experimenteller Teil.

Adipinsäure.

Die Säure wurde nach dem Verfahren von Wislicenus (Liebigs Ann. **149**, 221) durch Erhitzen von β-Jodpropionsäure mit 2 Gew.-Tln. molekularem Silber dargestellt. Die Ausbeute betrug 25 bis 35 Proz. der Theorie. Schmelzpunkt = 149,5°.

Versuch I.

Gewicht des Hundes: 8500 g. 1,3 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	10,17	30,0	49,28	0,145	
3.	10,92	32,0	136,8	0,316	
4.	5,36	10,45	41,98	0,03	7,2 g Adipinsäure $\left(\frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert.

Im Ätherextrakt des Harns vom Versuchstage nur Spuren kristallisierender Substanz.

Versuch II.

Gewicht des Hundes: 7300 g. 1,2 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	5,96	14,8	209,8	1,49	
3.	6,29	18,0	465,4	2,29	
4.	3,16	7,5	49,28	0,18	7,1 g Adipinsäure $\left(\text{beinahe } \frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert.

[1]) Über die Zuckerbildung aus Eiweiß. Zeitschr. f. exper. Path. u. Therapie II, 466.

Aus dem Ätherextrakt von $^{400}/_{1000}$ des Urins vom dritten Versuchstage werden 0,34 g Adipinsäure wiedergewonnen; nach Umkristallisieren aus Wasser Schmelzpunkt 149,5°.

Pimelinsäure.

Die Säure verdanken wir der Liebenswürdigkeit und dem Entgegenkommen der Firma E. Merck, Darmstadt. Schmelzpunkt 105°.

Versuch III.

Gewicht des Hundes: 7200 g. 1,2 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	7,49	19,8	292,0	1,38	
3.	7,36	20,0	456,3	2,21	
4.	3,21	7,5	98,55	0,23	8 g Pimelinsäure $\left(\frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert.

Versuch IV.

Gewicht des Hundes: 7700 g. 1,3 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	9,21	22,0	301,1	0,55	
3.[1]	4,10	7,2	95,82	0,17	10,4 g Pimelinsäure $\left(\frac{2/3 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert.

Aus dem Ätherextrakt von $^{360}/_{1000}$ Harn des Versuchstages werden nach Ausstreichen auf Tonplatten 1,8 g Säure gewonnen; sie schmelzen nach Umkristallisieren aus Benzol bei 105°.

Korksäure.

Käufliches Kahlbaumsches Präparat. Schmelzpunkt 139,5°.

---

[1]) Wegen der Stärke der Acidose bereits am dritten Tage injiziert.

Versuch V.

Gewicht des Hundes: 5000 g. 1,0 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	5,14	12,4	230,4	1,10	
3.	5,22	13,0	276,0	1,03	
4.	3,79	8,4	123,2	0,29	8,8 g Korksäure $\left(\frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert.

Aus $^{500}/_{1000}$ des eingeengten, angesäuerten und mit Ammonsulfat versetzten Harns vom dritten Versuchstage wird ein rötlicher, zum Teil grob kristallinischer Niederschlag gewonnen. Derselbe wird aus Wasser unter Zusatz von wenig Tierkohle umkristallisiert: Menge 2,63 g. Schmelzp. 140° [1]).

Versuch VI.

Gewicht des Hundes: 7500 g. 1,2 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	6,87	20,2	100,4	0,352	
3.	7,58	19,4	176,1	0,823	
4.	3,23	9,1	34,68	0,138	8,8 g Korksäure $\left(\frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert.

Aus $^{500}/_{1000}$ des Harns des Versuchstages, in der gleichen Weise wie oben verarbeitet, 2,47 g Korksäure. Schmelzpunkt 140°.

Azelaïnsäure.

Käufliches Kahlbaumsches Präparat. Schmelzpunkt 106°.

Versuch VII.

Gewicht des Hundes: 8500 g. 1,2 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	9,49	24,6	122,3	0,45	
3.	8,27	23,8	241,8	0,69	
4.	7,43	22,4	156,9	0,75	9,4 g Azelaïnsäure $\left(\frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert. Hund schwer krank, erholt sich.

[1]) Die geringen Säuremengen, die sich in einzelnen Versuchen noch im Ätherextrakt fanden, sind zur wiedergefundenen Säuremenge zuaddiert.

Aus $^{500}/_{1000}$ des eingeengten, angesäuerten und mit Ammonsulfat versetzten Urins vom dritten Versuchstage, zum Teil grobkristallinischer Niederschlag. Menge nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser: 2,37 g. Schmelzpunkt 106,5°.

Versuch VIII.

Gewicht des Hundes: 7700 g. 1,2 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	9,60	27,3	410,6	1,70	
3.	11,09	30,2	583,8	2,87	
4.	9,28	27,9	305,0	1,29	9,4 g Azelaïnsäure $\left(\frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert. Zu Ende des Versuches Hund schwer krank, erholt sich.

Aus $^{500}/_{1000}$ des wie oben behandelten Urins 2,38 g Substanz. Schmelzpunkt 106,5°.

Sebacinsäure.

Käufliches Mercksches Präparat, aus Wasser einmal umkristallisiert. Schmelzpunkt 132,5°.

Versuch IX [1]).

Gewicht des Hundes: 7700 g. 1,2 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	7,84	20,2	260,1	0,73	
3.	6,82	17,5	260,1	0,39	
4.	7,58	20,8	131,4	0,22	10,1 g Sebacinsäure $\left(\frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert.

Aus $^{500}/_{1000}$ des Urins vom dritten Versuchstage werden nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle 2,28 g Säure gewonnen. Schmelzpunkt 132,5°.

[1]) In diesem Versuche zeigte die Acetonkörperausscheidung keinen allmählichen Anstieg, wie wir ihn sonst immer beobachtet hatten; einen Grund hierfür (Versehen bei der Injektion des Phlorizins?) können wir nicht angeben.

Versuch X.

Gewicht des Hundes: 7700 g. 1,2 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	8,83	25,0	301,1	1,34	
3.	8,25	23,0	533,9	2,52	
4.	8,59	23,7	323,9	1,36	10,1 g Sebacinsäure $\left(\frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Mit der berechneten Menge $NaHCO^3$ neutralisiert.

Aus $^{240}/_{1000}$ Urin des Versuchstages auf gleiche Weise wie in Versuch IX 0,33 g kristallinische Säure erhalten.

Versuch XI. Benzoësäure.

Gewicht des Hundes: 12 000 g. 2 g Phlorizin.

Tag	Stickstoff g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	9,57	29,1	626,9	—	
3.	9,76	27,5	1,29	—	
4.	12,50	25,6	1,41	—	7,2 g benzoësaures Na $\left(\frac{1/2 \text{ Mol.}}{10}\right)$. Subcutan in 2 Portionen. Hund sehr schwer krank, erholt sich.

VII.

Die Bedeutung des Allantoins im Harnsäurestoffwechsel.

Von Privatdoz. Dr. **Wilhelm Wiechowski**, Assistenten am Institute.

(Aus dem pharmakologischen Institute der deutschen Universität Prag.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.)

1.

In einer früheren Mitteilung[1]) habe ich gezeigt, daß Harnsäure durch überlebende Hundeleber und Rinderniere zu Allantoin oxydiert wird. Die Reaktion erwies sich als eine vollständig verlaufende: die Harnsäure wurde restlos zersetzt. Außer dem Allantoin wurde kein anderes stickstoffhaltiges Produkt bei dieser Zersetzung gefunden, das Allantoin aber nahezu in quantitativer Ausbeute erhalten.

Die Bedeutung dieses Befundes für das Schicksal der Harnsäure im Säugetierorganismus war noch durch entsprechende Versuche am Lebenden darzutun, da die über diesen Gegenstand bisher veröffentlichten Versuche die Frage des Schicksals der Harnsäure teils nicht entscheiden, teils in einem anderen Sinne zu beantworten scheinen als die erwähnten Zersetzungsversuche.

Die hier interessierende Literatur über das Quale der Harnsäurezersetzung durch das Säugetier und über das Vorkommen von Allantoin im normalen Säugetierharne habe ich in der erwähnten Abhandlung bereits zusammengestellt. — Es genüge daher, hier nur kurz noch einmal folgendes zu erwähnen:

Salkowski[2]) einerseits und L. B. Mendel mit seinen Schülern Brown[3]) und White[4]) andererseits haben bei Hunden und Katzen

---

[1]) Diese Beiträge 9, 295, 1907.
[2]) Zeitschr. f. phys. Chem. 35, 494—500.
[3]) Amer. Journ. of Phys. 3, 261—270.
[4]) Ebenda 12, 85—94.

nach Harnsäurezufuhr (per os oder intravenös) Allantoin mehr oder minder reichlich im Harn nachweisen können. Eine Vorstellung aber über das Ausmaß dieser Allantoinausscheidung im Verhältnis zur Menge der eingeführten Harnsäure gestatten diese Versuche, abgesehen von den unzulänglichen Methoden der Allantoinbestimmung, deshalb nicht, weil weder auf eine eventuell vorhandene normale Allantoinausscheidung Rücksicht genommen, noch auch stets der unverändert ausgeschiedene Teil der beigebrachten Harnsäure bestimmt wurde, und übrigens die Resorption der Harnsäure im Darm des Hundes ungenügend ist. Poduschka[1]) und Pohl[2]) haben nach Zufuhr mäßiger Mengen von Harnsäure per os kein Allantoin im Hundeharn nachgewiesen. Desgleichen hat Swain[3]) nur nach sehr großen Harnsäuredosen Allantoin im Harn von Hunden gefunden. Während es dergestalt also noch nicht endgültig entschieden ist, in welchem Umfange Hunde nach Harnsäurezufuhr Allantoin ausscheiden bzw. ob sie dies überhaupt tun, geben Salkowski[4]) und Mendel und White[5]) übereinstimmend an, daß Kaninchen nach Harnsäurefütterung (bzw. Injektion) kein Allantoin im Harn ausscheiden. Daraus folgerte man, daß die Pflanzenfresser im Gegensatz zu den Fleischfressern Harnsäure zu Harnstoff abbauen und dachte wohl an einen generellen Unterschied im Wesen der Urikolyse zwischen diesen Säugetiergruppen[6]).

Was nun das für den Harnsäurehaushalt des Säugetieres ebenso wichtige Vorkommen von Allantoin in normalen Harnen anlangt, so ergibt sich aus der Literatur, daß nur gelegentlich Allantoin in normalen Harnen gefunden wurde und man es demgemäß nicht als einen regelmäßigen (normalen) Harnbestandteil anzusehen gewohnt ist. Das geht auch daraus hervor, daß in allen angeführten Versuchen eine solche normale Allantoinausscheidung gänzlich unberücksichtigt bzw. unerwähnt bleibt. Als erster fand Salkowski[7]) Allantoin im Harn mit Fleisch gefütterter Hunde, ein Befund, der dann namentlich von Mendel und seinen Mitarbeitern bestätigt wurde. Dagegen konnte Mendel im Harn von mit Fleisch gefütterten Katzen kein Allantoin finden. In großem Umfange

[1]) Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **44**, 59.

[2]) Ebenda **48**, 367.

[3]) Amer. Journ. of Phys. 6, 38—47.

[4]) A. a. O.

[5]) A. a. O.

[6]) R. Burian, Die Bildung und Ausscheidung der Harnsäure beim Menschen. Med. Klinik 1905 und oben S. 12 u. 16 des Separatabdruckes.

[7]) B. B. 9, 719.

wurde ferner Allantoin im Hunde- und Katzenharn bei purinreicher Ernährung nachgewiesen. Während Meissner[1]) im Jahre 1868 in zwei Kaninchenharnen Allantoin fand, wurde es, wie gesagt, in neuerer Zeit hier stets vermißt[2]), dagegen wies es Salkowski[3]) in normalem Kuhharn nach, und dieser Befund ist wohl mit Rücksicht auf die bisherigen Anschauungen über das Wesen der Pflanzenfresserurikolyse von großer Bedeutung.

Die Abwesenheit von Allantoin in den meisten Harnen würde nun a priori nicht beweisen, daß es nicht intermediär im Stoffwechsel gebildet wird. — Mendel und White (l. c.) sowie Swain (l. c.) machen in der Tat diese Annahme, wobei sie sich auf Versuche von Luzzatto[4]) stützen, der nach Allantoinzufuhr beim Kaninchen vermehrte Oxalsäureausscheidung gefunden hat. — Doch muß hier die erwiesene Unangreifbarkeit des Allantoins im Hundeorganismus [Minkowski[5]), Poduschka[6])] zur Vorsicht mahnen, ohne weiteres bei anderen Säugetieren eine weitgehende Allantoinzersetzung anzunehmen. Im Gegenteil, es war eher zu vermuten, daß, wenn Allantoin im Lebenden ebenso aus Harnsäure entsteht wie in überlebenden Organen, es im Harn auch gefunden werden müsse. In diesem Sinne nun stimmen meine zitierten Zersetzungsversuche mit der Mehrzahl der publizierten Befunde nicht überein. Ich habe daher das Allantoin von neuem nach Harnsäurefütterung bzw. Injektion im Harn gesucht.

Da die teilweisen Widersprüche in der Literatur dieses Gegenstandes durch Mängel der Methodik hervorgerufen sein konnten und mir Versuche mit den bisherigen Methoden der Allantoinbestimmung keine befriedigenden Resultate geliefert haben, suchte ich nach einer neuen Methode. Nach vielfachen Versuchen bin ich schließlich zu einem Verfahren gelangt, welches ermöglicht, Allantoin aus Harn quantitativ und analysenrein, kristallisiert abzuscheiden. Die Methode beruht auf der Beobachtung, daß eine verdünnte Lösung von Mercuriacetat bei Gegenwart von viel Natriumacetat das Allantoin quantitativ als weißen Niederschlag ausfällt. Im Harn, der mit Phosphorwolframsäure, Blei- und Silberacetat gereinigt ist, fällt eine 0,5 proz. mit Natriumacetat versetzte

[1]) Zeitschr. f. rationelle Medizin 31, 303.
[2]) L. B. Mendel und B. White, l. c., p. 86.
[3]) Zeitschr. f. phys. Chem. 42, 213 (1904).
[4]) Ebenda 36, 537—543 (1903).
[5]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 41, 375 (1898).
[6]) Ebenda 44, 59 (1900).

Quecksilberacetatlösung nur das Allantoin, dieses aber vollständig aus. Aus dem gewaschenen und mit Schwefelwasserstoff zersetzten Niederschlage kristallisiert das Allantoin beim Eindampfen sofort schmelzpunktrein aus (siehe Methodik S. 121).

2. Die normale Allantoinausscheidung.

Die Anwendung dieser Methode auf verschiedene Tierharne führte zu dem überraschenden Resultat, daß in allen untersuchten Harnen von Hunden, Kaninchen (einer Katze und einem Affen) Allantoin in reichlicher Menge vorhanden war und selbst nach vieltägigem Hungern nicht daraus verschwand. Ja, es zeigte sich, daß die Allantoinausscheidung von vorher mit Hafer gefütterten Kaninchen und fleischfrei ernährten Hunden im Hunger[1]) gar nicht abnahm.

Fortl. Nummer	Tierart	Gesamt-N des Harns von 24 Stund. g	Allantoin g	Harnsäure g	Ernährung
1.	♀ Hund A, 3450 g	4,70	0,19	—	Semmeln und Fett.
2.	„ 3450 „	3,86	0,28	—	Fleisch, Speck, Semmeln.
3.	„ 3450 „	1,37	0,21	—	seit 48 Stunden Hunger.
4.	„ 3450 „	1,38	0,18	—	seit 3 Tagen Hunger.
5.	„ 2860 „	1,36	0,19	—	seit 7 Tagen Hunger.
6.	♀ Hund B	1,20	0,28	0,02	seit 24 Stunden Hunger. früher Semmeln und Fett.
7.	„ 5250 „	1,43	0,29	0,02	seit 4 Tagen Hunger.
8.	♂ Kaninchen I, 1530 „	—	0,09	—	Hafer.
9.	„ 1250 „	—	0,11	—	seit 4 Tagen Hunger.
10.	♂ Kaninchen II, 1320 „	0,39	0,15	—	Hafer.
11.	„ 1320 „	0,49	0,14	—	Hafer.
12.	♂ Kaninchen III, 1680 „	0,70	0,09	0,02	Hafer.
13.	„ 1680 „	—	0,10	—	Hafer.
14.	♂ Kaninchen IV, 1620 „	0,74	0,14	0,009	Hafer.
15.	„ 1630 „	0,76	0,13	0,008	Hafer.
16.	60 ccm Katzenharn	—	0,09	0,003	?
17.	100 ccm Affenharn	—	0,10	0,000	? kein Fleisch.

[1]) Nach Abschluß dieser Arbeit erschien der Bericht über die Sitzung der Society for Experimental Biology and Medicine in New York vom 22. Mai 1907 im Zentralbl. f. Physiol. **21**, 295, demzufolge F. P. Underhill in dieser Sitzung über „das Vorhandensein von Allantoin im Urin von fastenden Hunden" berichtet hat.

Wir haben also das Allantoin als ein konstantes Produkt des inneren Stoffwechsels der genannten Tiere anzusehen. Bei Berücksichtigung des Befundes von Salkowski[1]), daß normaler Kuhharn reichlich Allantoin enthält, liegt es nahe, anzunehmen, daß diese Erkenntnis für alle Säugetiere Geltung habe.

Von Wichtigkeit erscheint insbesondere auch mit Rücksicht auf die negativen Befunde von Salkowski (l. c.) und Mendel und White (l. c.) das regelmäßige Vorkommen von Allantoin im Kaninchenharn und im Hinblick auf das noch zu erwähnende Verhalten des Menschenharns, das Vorkommen von Allantoin im Harn des Affen.

Die Betrachtung der Tabelle lehrt ferner, daß der Allantoinwert des 24 stündigen Harns für ein und dasselbe Tier bei purinfreier Kost eine sehr konstante Größe besitzt, trotz ausgiebiger Schwankungen der täglichen Gesamtstickstoffausscheidung (Nr. 1 und 3, 4, 5; ferner 6 und 7, sowie 10 und 11 der Tabelle), und daß die täglich ausgeschiedene Allantoinmenge verschiedener Individuen (Kaninchen) in keinem Verhältnis zu ihrem Gewichte und der Größe ihrer täglichen Gesamtstickstoffausscheidung steht. Diese Regelmäßigkeit stimmt gut mit den Erfahrungen überein, die man über die Konstanz der Purinausscheidung beim Menschen gemacht hat, bzw. mit der Unabhängigkeit der endogenen Harnsäuremenge des Harns von der (purinfreien) Ernährung (vgl. Burian und Schur[2]). — Das Quantum der täglichen Allantoinausscheidung bei purinfreier Kost erscheint so als ein zahlenmäßiger Ausdruck für die Individualität eines Tieres, und stellt vielleicht ein prägnanteres Maß für die reagierende Masse des Organismus dar als sein Gewicht.

Die Größe der Allantoinausscheidung ist verhältnismäßig beträchtlich. Mittelgroße Kaninchen scheiden pro die 0,10 bis 0,15, kleine Hunde (von 3,5 bis 5 kg) 0,2 bis 0,3 Allantoin aus. Jedenfalls ist die Ausscheidung groß genug, um den Wert des nach den gebräuchlichen Methoden bestimmten Harnstoff-N deutlich zu beeinflussen, der ja z. B. nach den Methoden von Mörner-Sjöqvist oder Pflüger-Schöndorff bzw. Pfaundler auch den ganzen Allantoin-N in sich begreift.

Im Zusammenhange mit der bereits (durch Minkowski und Poduschka) experimentell festgestellten Unangreifbarkeit des Allantoins im Hundeorganismus spricht die reichliche Allantoin-

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 42, 213 (1904).
[2]) Pflüg. Arch. 94, 273 (1902).

ausscheidung der Kaninchen dafür, daß auch in deren Organismus eine irgend in Betracht kommende Allantoinzersetzung nicht stattfindet. Es ist zu vermuten, daß diese Annahme auch für Katzen und Affen und nach dem zitierten Befunde von Salkowski auch für Rinder Geltung habe. Entsprechende Versuche habe ich zwar noch nicht angestellt, und wenn auch noch andere Sängetierharne in dieser Richtung untersucht werden sollen, so glaube ich doch, daß schon das vorliegende Material den Schluß gestattet: daß das Allantoin ein **terminales** Produkt des Säugetierstoffwechsels darstellt.

Gegenüber dem hohen Allantoingehalt der untersuchten Säugetierharne ist deren niedriger Harnsäuregehalt bemerkenswert (Nr. 6, 7, 12, 14, 15, 16, 17 der Tabelle), wobei noch zu bedenken ist, daß bei so geringen Harnsäuremengen die Bestimmungen meist zu hoch ausfallen bzw. überhaupt unsicher sind[1]).

Dieses bei allen untersuchten Tierharnen wiederkehrende typische Bild: viel Allantoin und wenig Harnsäure, gestattet schon, wenn — wie wohl mit Recht — hauptsächlich oder ausschließlich eine oxydative Entstehung des Allantoins im Säugetierorganismus angenommen wird, unter Berücksichtigung des oben ausgeführten den Schluß, daß das Allantoin das Endprodukt des Harnsäurestoffwechsels der Säugetiere darstellt und daß die geringen Mengen gleichzeitig ausgeschiedener Harnsäure als durch vorzeitige Ausscheidung der Oxydation entgangenes Zwischenprodukt anzusehen sind.

Allantoinbestimmungen im Harn von Hunden und Kaninchen haben denn auch die Richtigkeit dieses Schlusses erwiesen, indem sie zeigten, daß eingeführte Harnsäure bei diesen Tieren als Allantoin ausgeschieden wird.

3. Die Harnsäurezersetzung durch Hunde und Kaninchen.

a) Hundeversuche.

Die Versuche wurden an hungernden weiblichen Hunden ausgeführt, denen durch hintere Kolpotomie die Urethralöffnung

[1]) Die Harnsäure wurde nach Ludwig-Salkowski isoliert und durch N-Bestimmung der schließlich auf dem Filter gesammelten minimalen, braunen Flocken gemessen. Bei Inarbeitnahme eines Drittels bis Viertels der Tagesharnmenge wurden immer nur Bruchteile eines Cubikcentimeters $^{1}/_{10}$ n-Säure verbraucht. — Eine typische kristallinische Abscheidung wurde in normalen Kaninchen- und Hundeharnen niemals beobachtet. Vgl. zur Bestimmung geringer Harnsäuremengen: Brugsch und Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Pharm. 4, 440 (1907).

freigelegt worden war. — Der Harn wurde alle 24 Stunden mittels Katheter abgegrenzt. Die Harnsäure wurde als Lösung von Natrium uricum (Schuchardt) in destilliertem Wasser mittels Bürette unter die Rückenhaut genau zugemessen. Der Rest der Injektionsflüssigkeit wurde stets analysiert.

Der erste Versuch wurde in der Periode der gleichmäßigen N-Ausfuhr angestellt. Stuhl wurde während der Versuchsdauer nicht abgesetzt.

Hündin A.

Datum	Gewicht g	Gesamt-N g	Allantoin g	Bemerkungen
8. April 1907	3450	—	—	Nahrung entzogen, Wasser ad libitum.
9. „ „	—	—	—	
10. „ „	—	1,08	—	
11. „ „	—	1,37	0,21	
12. „ „	—	1,38	0,18	
13. „ „	—	—	—	0,45 g Harnsäure sbct. = 0,42 g Allant. = 0,15 g N.
14. „ „	—	1,73	0,44	
15. „ „	—	1,40	0,21	
16. „ „	2860	1,36	0,19	
17. „ „	—	1,31	0,18	

Zugeführt wurden 100 ccm einer Lösung von harnsaurem Natrium, von der 5 ccm nach Kjeldahl bestimmt, 0,007 63 g N enthielten, somit 0,45 g Harnsäure (= 0,42 g Allantoin). Die normale Allantoinausscheidung betrug im Mittel aus zwei Vortagen und zwei Nachtagen etwa 0,19 g, daher die Mehrausscheidung am Injektionstage 0,25 g. Die Steigerung der Allantoinausscheidung nach Harnsäureinjektion ist also sehr ansehnlich; ein Vergleich mit der Einfuhr ist aber nicht möglich, weil in diesem Falle die Harnsäureausscheidung nicht bestimmt wurde. — Die durchaus gleichmäßige Gesamtstickstoffausscheidung erfährt am Injektionstage eine Steigerung, die über das Maß des zugeführten N weit hinausgeht. Wir haben es hier jedenfalls mit einer toxischen Steigerung des N-Stoffwechsels zu tun, welche jedoch auf den Injektionstag beschränkt bleibt. Eine gesteigerte Diurese am Versuchstage war nicht vorhanden, im Gegenteil, der Harn war so konzentriert, daß das Allantoin in der vorgelegten Schale in schönen Kristallen ausfiel.

In einem zweiten Versuche (Hündin B) wurden auch die Details der N-Ausfuhr im Harn studiert.

Hündin

Datum	Gewicht g	Gesamt-N g	Nicht basischer Gesamt-N g	Amidartiger N g	Fest gebundener N[1] g
10. Juli 1907	—	—	—	—	—
11. Juli 1907	—	1,3335 1,3335 } 1,3335	1,2075 1,1970 } 1,202 25	1,1235 1,1130 } 1,1182	0,0840
12. Juli 1907	5250	1,8790 1,8790 } 1,8790	1,6590 1,6485 } 1,653 7	1,5544 1,6380 } 1,5962	0,0575
13. Juli 1907	—	1,5225 1,5225 } 1,5225	1,4280 1,4280 } 1,428 0	1,3440 1,3440 } 1,3440	0,0840

Die N-Fraktionierung geschah nach Pfaundler, somit ist der Gesamt-N, und vom nichtbasischen N der Gesamt-N und der amidartige N bestimmt, der festgebundene N[1]) und der gesamte basische N berechnet. Der Allantoin-N ist nach der weiter unten beschriebenen Methode teils direkt bestimmt, teils aus dem gewogenen Allantoin berechnet, der Harnstoff-N ist aus dem amidartigen N durch Abziehen des Allantoin-N ebenfalls berechnet. Die Harnsäure wurde nach Ludwig-Salkowski isoliert und durch N-Bestimmung nach Kjeldahl gemessen.

Injiziert wurden 167,8 ccm Natriumuratlösung. Je 10 ccm der Lösung wurden mit Salzsäure auf dem Wasserbade eingeengt und der N-Gehalt der ausgeschiedenen *ū* nach Kjeldahl ermittelt.

Die normale Harnsäureausscheidung betrug im Mittel aus den gut übereinstimmenden Werten des Vor- und Nachtages 0,022 g. Die Ausscheidung am Versuchstage 0,15 g. Von der subcutan gereichten Harnsäure = 0,5984 g wurden daher an diesem Tage 0,128 g = 21,4 Proz. der Zufuhr unverändert ausgeschieden. Die normale Allantoinausfuhr betrug im Mittel aus dem Vor- und Nachtagswerte 0,29, am Versuchstage 0,75, somit die Mehrausscheidung am Versuchstage 0,461 g. Die nicht wieder ausgeschiedene Harnsäure = 0,47 g entspricht 0,442 g Allantoin, wovon 0,46 = 104,5 Proz. ausgeschieden worden sind.

Die Gesamtstickstoffausscheidung erfährt am Tage der Harnsäurezufuhr eine weit über das Maß des injizierten N hinausgehende Steigerung, auch am Nachtage wird noch deutlich mehr

[1]) Oxyproteïn- und Aminosäuren.

B.

Stickstoff		Basischer Stickstoff		Allantoin	Harnsäure	Bemerkung
Allantoin-N g	Harnstoff-N g	Gesamt-N g	Harnsäure-N g	g	g	
—	—	—	—	—	—	Futter entzogen.
0,0987 / 0,0974 } 0,098 05	1,020 15	0,131 25	— / 0,007 56 } 0,007 56	0,282 / 0,278 } 0,280	— / 0,0228 } 0,0228	0,598 358 $\bar{u}$ = 0,198 507 N subcutan
0,2632 / 0,2623 } 0,262 75	1,273 45	0,225 3	0,049 98 / 0,049 98 } 0,049 98	0,752 / 0,750 } 0,751	0,1506 / 0,1506 } 0,1506	
0,1039 / 0,1039 } 0,103 9	1,240 1	0,094 5	0,006 72 / 0,007 56 } 0,007 14	0,2969 / 0,2969 } 0,2969	0,0203 / 0,0228 } 0,0215	

N ausgeschieden. Diese Mehrausscheidung erfolgt an beiden Tagen auf Kosten des Harnstoffs. Während der „festgebundene" N, der Harnsäure- und Allantoin-N am Vor- und Nachtage gut übereinstimmende Werte aufweisen, ist der Harnstoff-N am Nachtage nur wenig kleiner als am Tage des Versuches. Also auch in diesem Versuche hatte die Harnsäureinjektion eine toxische Steigerung des Stoffzerfalles verursacht. Dagegen ist der „festgebundene" N am Versuchstage vermindert.

Die subcutan injizierte Harnsäure erschien somit zu 21 Proz. unverändert im Harn, der Rest aber wurde vollständig in Allantoin übergeführt und als solches ausgeschieden; für eine Umwandlung zu Harnstoff oder Aminosäuren fehlt jeder Anhaltspunkt. — In Übereinstimmung mit dem Zersetzungsversuche durch überlebende Hundeleber zeigt also auch dieser Versuch am Lebenden, daß das einzige stickstoffhaltige Zersetzungsprodukt der Harnsäure beim Hunde das Allantoin ist.

b) Versuche an Kaninchen.

Die Versuche wurden an männlichen Tieren ausgeführt; der Harn mittels Katheter abgegrenzt und die Harnsäure als Natrium uricum (Schuchardt) in Lösung teils per os, teils in derselben Weise, wie bei den Hundeversuchen angegeben wurde, subcutan injiziert.

Kaninchen A.

Datum	Gewicht g	Harnmenge g	Allantoin g	Bemerkungen
5. Dez. 1906	1530	45	0,093 F. P. 234	Hafer entzogen.
6. " "	—	45	—	
7. " "	1380	105	—	
8. " "	—	125	—	
9. " "	1250	58	0,112 } 0,112 0,112 }	
10. " "	—	—	—	0,2 Natr. uricum = 0,122 Allantoin per os.
11. " "	1200	125	0,21	
12. " "	—	—	—	Diarrhoe.
13. " "	1050	—	—	
14. " "	—	—	—	†.

Nach fünftägigem Hunger war die Allantoinausscheidung pro 24 Stunden im wesentlichen unverändert geblieben. Sie betrug im Mittel 0,10; nach Eingabe von 0,2 Natriumurat per os, welche 0,12 Allantoin entsprechen (0,2 des Präparates enthalten nach zahlreichen Bestimmungen 0,13 $\bar{u}$), schied das Tier 0,21 Allantoin aus, somit 0,11 mehr als an den Normaltagen, = etwa 92 Proz. der aus der gereichten Harnsäure berechneten Allantoinmenge.

In diesem Versuche wurde also die gereichte Harnsäure so gut wie quantitativ als Allantoin ausgeschieden.

Etwas anders verlief ein zweiter Versuch, wo Harnsäure subcutan injiziert wurde. Neben $\bar{u}$ und Allantoin wurde auch die N-Verteilung im Harn nach Pfaundler ermittelt. Für diesen Versuch haben demnach alle bei Hündin B gemachten analytischen Bemerkungen ebenfalls Geltung. Injiziert wurden 93,5 ccm Uratlösung, von der je 5 ccm zufolge N-Bestimmung nach Kjeldahl enthielten: 0,0160 und 0,0160 g $\bar{u}$. (Vgl. Tabelle S. 120.)

Die normale Harnsäureausscheidung, aus den Werten des Vor- und Nachtages berechnet, beträgt 0,0085 g; die $\bar{u}$-Ausscheidung am Injektionstage 0,025 g, es wurden also 0,0165 g $\bar{u}$ unverändert ausgeschieden, d. i. etwa 5,6 Proz. der injizierten Menge von 0,29987 g; aus dem nicht ausgeschiedenen Rest berechnet sich eine Allantoinmenge von 0,266 g. — Als Normalwert für die Allantoinausscheidung nehme ich den Wert des Nachtages = 0,13 g Allantoin an, da am Vortage nur eine einfache Bestimmung in wenig Harn gemacht werden konnte. Die Allantoinausscheidung des Versuchstages beträgt 0,28 g, ist somit um 0,15 gegen die Norm erhöht, welche Mehrausscheidung etwa 56,4 Proz. der sich aus dem nicht aus-

geschiedenen Teile der injizierten Harnsäure berechnenden Allantoinmenge von 0,266 g ausmacht. Also wurde hier im Verhältnis zu der verarbeiteten Harnsäuremenge bedeutend weniger Allantoin ausgeschieden als im vorigen Versuche. Nun ist aber der N-Stoffwechsel des Versuchstieres durch die Harnsäureinjektion offenbar in arge Unordnung geraten. Die aus den gut übereinstimmenden Werten für Gesamtstickstoff von Vor- und Nachtag sich berechnende durchschnittliche Stickstoffausscheidung pro die = 0,75 g gesetzt, ergibt sich am Versuchstage bei Zufuhr von rund 0,1 g N und einer Ausscheidung von rund 0,69 g ein Stickstoffdefizit von 0,16 g. Desgleichen wird am Injektionstage weniger Harnstoff ausgeschieden. Dagegen weist der „festgebundene“ Stickstoff am Tage der Harnsäurezufuhr eine Vermehrung um 0,08 g auf gegenüber dem aus den übereinstimmenden Werten des Vor- und Nachtages sich ergebenden Mittel von 0,07 g. Dieser Befund läßt aber nicht den Schluß zu, daß ein Teil der injizierten Harnsäure als Aminosäuren ausgeschieden worden sei, vielmehr charakterisiert er sich schon dadurch als pathologisch, daß die Mehrausscheidung an Aminosäuren-N das Defizit im Harnsäure-Allantoin-N (0,04 g N) (gegenüber der injizierten Stickstoffmenge) um 100 Proz. übersteigt, abgesehen davon, daß diese Fraktion des Harnstickstoffs nicht einheitlich den Aminosäuren, sondern vermutlich größtenteils den Oxyproteïnsäuren angehört. Auch der hohe Wert für basischen Stickstoff am Nachtage zeigt noch eine ausgiebige Störung im N-Stoffwechsel an. Merkwürdigerweise bleibt das Gewicht des Tieres während des ganzen Versuches konstant. Auch in einem anderen Versuche, wo Harnsäure subcutan injiziert wurde, war ein ähnliches Verhalten der Gesamtstickstoffausscheidung zu beobachten, diese fiel von 0,7 auf 0,2 (!) am Tage der Injektion. — Subcutan injizierte Harnsäure ist offenbar für Kaninchen nicht gleichgültig, sondern verursacht eine in ihrem Wesen noch aufzuklärende Stoffwechselstörung [1]).

Jedenfalls aber kann als sichergestellt gelten, daß auch Kaninchen nach Harnsäurezufuhr reichlich Allantoin ausscheiden. Nach Versuch 1 zu schließen, führen auch die Kaninchen Harnsäure quantitativ in Allantoin über (wie die Hunde). Anhaltspunkte für eine Weiterzersetzung des Allantoins, für Bildung von Harnstoff aus eingeführter Harnsäure, bieten die Versuche nicht.

---

[1]) E. Starkenstein, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 57, 27 (1907), beobachtete in unserem Laboratorium nach intravenöser Harnsäureinjektion an Kaninchen gelegentlich Eiweißausscheidung im Harn.

Kaninchen

Datum	Gewicht	Gesamt-N	Nicht basischer		
			Gesamt-N	Amidartiger N	Fest gebundener N[1])
	g	g	g	g	g
9. Juli 1907	1620	—	—	—	—
10. Juli 1007	—	0,7350 } 0,7420 } 0,738	0,720 } 0,720 } 0,720	0,644 } 0,658 } 0,651	0,069
11. Juli 1907	1630	0,686 } 0,703 } 0,6945	0,658 } 0.672 } 0,665	0,518 } 0,518 } 0,518	0,147
12. Juli 1907	1630	0,763 } 0,763 } 0,763	0,616 } 0,588 } 0,602	0,532 } 0,532 } 0,532	0,070

Ein Teil der Hunden und Kaninchen subcutan gereichten Harnsäure wird unverändert im Harn ausgeschieden. — Die betreffenden Bruchteile der injizierten Mengen weisen in den mitgeteilten Versuchen durchaus nicht jene Werte auf, die Burian und Schur[2]) gefunden haben (bei Hunden 3 bis 5 Proz., bei Kaninchen 15 bis 16 Proz. der Zufuhr) und als konstant ansehen, indem sie die Annahme machen, daß jedem Tiere ein für die Spezies sozusagen charakteristisches Ausmaß der Urikolyse zukomme. — Die Menge der unzersetzt ausgeschiedenen Harnsäure hängt offenbar von sekundären, mehr äußerlichen Momenten ab (Schnelligkeit der Resorption, Individualität, Ausmaß der Diurese usw.) und ist nicht im Wesen der Urikolyse begründet. — Im allgemeinen wird die in Zirkulation gesetzte Harnsäure ebenso restlos zu Allantoin oxydiert, wie es durch überlebende Organe geschieht, und nur durch vorzeitige Ausscheidung kann ein Teil der Harnsäure der vitalen Zersetzung entgehen[3]).

[1]) Oxyproteïn- und Aminosäuren.

[2]) Pflügers Arch. 87.

[3]) Ganz anders als die besprochenen Säugetiere scheint sich der Mensch zu verhalten. Wiewohl die von mir befolgte Methode auch im Menschenharn vollkommen befriedigende Resultate liefert, habe ich niemals in diesem Allantoin mit Sicherheit nachweisen können. Bestenfalls kann es sich bloß um Allantoinspuren handeln. In dieser Beziehung fällt das gegensätzliche Verhalten gegenüber den untersuchten Tierharnen besonders deutlich auf, wenn die gleichzeitige Harnsäureausscheidung berücksichtigt wird. Im Tierharn viel Allantoin und wenig oder keine Harnsäure, im Menschenharn kaum oder nur Spuren von Allantoin und viel Harnsäure. — Die im Anschluß an diese Beobachtungen unternommenen Versuche über die Beziehungen des Allantoins zum Harnsäurestoffwechsel des Menschen und über das Schicksal der Harnsäure im menschlichen Organismus sollen später mitgeteilt werden.

B.

Stickstoff		Basischer Stickstoff		Allantoin	Harnsäure	Bemerkung
Allantoin-N g	Harnstoff g	Gesamt-N g	Harnsäure-N g	g	g	
—	—	—	—	—	—	
— 0,049 4 } 0,049	0,602	0,0185	0,0035 0,0028 } 0,003 15	— 0,1413 } 0,14	0,010 0,0084 } 0,009	0,299 87 ū = 0,099 49 N subcutan.
0,098 56 0,097 55 } 0,098	0,420	0,0295	0,009 0,0077 } 0,008 35	0,2816 0,2787 } 0,28	0,0232 0,0274 } 0,025	
0,045 54 0,043 86 } 0,045	0,487	0,161	0,0028 — } 0,0028	0,130 0,128 } 0,129	0,008 — } 0,008	

4. Methodik.

Die bisher bekannt gewordenen Fällungsreaktionen des Allantoins: mit Silbernitrat bei schwach alkalischer Reaktion und mit Mercurinitrat haben für die Praxis der Allantoinbestimmung nur wenig Brauchbares geleistet. — Mit den auf Grund der Silberfällung von Löwi und Poduschka für den Harn ausgearbeiteten Allantoinbestimmungsmethoden, habe ich keine günstigen Erfahrungen gemacht. Abgesehen von den Störungen durch oft weitgehende Schwärzung der Niederschläge, scheint bei beiden Methoden die Fällung weder stets quantitativ zu sein, noch auch ausschließlich das Allantoin zu betreffen[1]). Das Mercurinitrat fällt aber neben anderen leicht entfernbaren Substanzen auch den schwer zu entfernenden Harnstoff aus.

Versuche, Allantoin und Harnstoff durch Mercurinitrat zu fällen und aus dem durch Schwefelwasserstoff zerlegten Niederschlage das Allantoin durch Weglösen des Harnstoffs mit Amylalkohol[2]) zu isolieren, führten zwar zu reinen Produkten, die Methode erwies sich aber als viel zu umständlich für fortlaufende Versuche und dürfte sich mit Vorteil nur für präparatorisches

[1]) Auch H. D. Dakin, Journ. of biol. Chem. 3, 51—79 (1907), hat, wie ich nach Abschluß dieser Arbeit sehe, mit der Löwischen Methode keinen Erfolg gehabt. Er fand das erhaltene Produkt unter anderem reichlich verunreinigt mit durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen und mit Harnstoff. Seine Angaben stimmen mit meinen Erfahrungen überein, weshalb ich nicht weiter auf die Kritik der Silbermethoden eingehe, sondern auf die Dakinsche Arbeit verweise.

[2]) In ähnlicher Weise, wie Lippich zur Lösung des Harnstoffs ein Gemisch von Amyl- und Äthylalkohol benutzt hat.

Arbeiten zur Trennung von Harnstoff und Allantoin eignen. Da das Allantoin, welches aus Mercurinitratniederschlägen abgeschieden wird, sich im Gegensatze zu dem aus der Silberverbindung freigemachten durch eine auffallende Neigung zu kristallisieren auszeichnet, suchte ich nach einem anderen Quecksilberoxydsalz, welches das Allantoin fällt, ohne aber auch den Harnstoff niederzuschlagen. Von allen untersuchten Quecksilbersalzen entsprach nur das Quecksilberacetat bei Einhaltung gewisser Bedingungen dieser Anforderung.

Das Quecksilberacetat löst sich leicht im Wasser zu einer sauer reagierenden Flüssigkeit, welche beim Stehen allmählich gelbes Oxyd absetzt. Diese Lösung erzeugt, wenn überhaupt, nur in konzentrierten Allantoinlösungen einen weißen, flockigen Niederschlag; wird sie aber durch Eintragen von Natriumacetat neutralisiert oder schwach alkalisch gemacht, so löst sich das abgeschiedene Quecksilberoxyd wieder auf und diese Lösung fällt nun auch aus ganz verdünnten Allantoinlösungen das Allantoin quantitativ aus, insbesondere dann, wenn man in dem Reaktionsgemisch noch Natriumacetat bis zur alkalischen Reaktion auflöst[1]). Stellt man nun die Reaktion mit einer Harnstofflösung an, so zeigt sich bei reichlichem Zusatz von konzentrierten Mercuriacetatlösungen zu verdünnten Harnstofflösungen nach einiger Zeit ebenfalls ein allerdings geringfügiger und sandiger Niederschlag, in stärkeren Harnstofflösungen tritt dagegen keine Fällung ein. Setzt man jedoch zu den mit Mercuriacetat bewirkten ungefällten Harnstofflösungen fixes Alkali bis zur deutlichen alkalischen Reaktion, so wird der Harnstoff ebenso niedergeschlagen, wie unter den gleichen Bedingungen durch Sublimat. Offenbar fällen sehr konzentrierte Mercuriacetatlösungen partiell den Harnstoff auch bei Abwesenheit von freiem Alkali, diese Fällung ist aber (wie man sich leicht überzeugen kann) schon in mäßigem Harnstoffüberschuß löslich, weshalb in konzentrierten Harnstofflösungen mit dem Reagens kein Niederschlag zu erzielen ist. Der Unterschied in der Fällbarkeit des Harnstoffs und des Allantoins durch Mercuriacetat ist also zwar ein sehr bedeutender, aber bloß quantitativer. Es genügt z. B. von einer mit Natriumacetat neutralisierten 5 proz. Mercuriacetatlösung $^1/_{20}$ Volumen, um eine 0,1 proz. Allantoinlösung vollständig auszufällen — für eine 0,1 proz. Harnstofflösung braucht man aber das gleiche oder doppelte Volumen, um eine geringe staubige Fällung zu erzielen. Der Unterschied in der Fällbarkeit von Allantoin und Harnstoff ist so groß, daß mir anfangs die partielle Fällbarkeit des Harnstoffs durch das Reagens überhaupt entgangen war.

Verdünnt man nun das Reagens successive, so verliert es nichts an seiner Wirksamkeit gegen Allantoinlösungen, wogegen man immer größere

---

[1]) Der die Ausflockung fördernde Einfluß des Natriumacetats tritt nicht erst bei Erzielung alkalischer Reaktion, sondern schon weit früher ein (die alkalische Reaktion zeigt nur das Vorwalten des Natriumacetats an) und dürfte daher nicht in dieser, sondern in der Zurückdrängung der Dissociation der die Quecksilberverbindung des Allantoins lösenden freiwerdenden Essigsäure begründet sein.

Mengen braucht, um auch in verdünnten Harnstofflösungen eine geringe Reaktion zu erhalten, bis diese schließlich überhaupt ausbleibt und man mit einer 1 bis 0,5 proz. mit Natriumacetat neutralisierten Lösung von Mercuriacetat unter keinen Umständen eine Reaktion in Harnstofflösungen erzielt; mag man schwache oder starke Harnstofflösungen verwenden oder gar in viel Reagens wenig Harnstoff in Substanz eintragen, bemerkenswerterweise auch nicht bei Anwesenheit von Salpeter; es läßt sich eben bei Verwendung eines so verdünnten Reagens niemals diejenige Konzentration an Mercuriacetat erzielen, bei welcher der Harnstoff auszufallen beginnt.

Es wurde auf Grund dieser Erfahrungen für die Versuche eine 0,5 proz. Auflösung von Mercuriacetat in etwa 30 proz. Natriumacetatlösung hergestellt, welche Harnstoff nur auf Zusatz von viel Alkali partiell fällt, dagegen Allantoin noch in größter Verdünnung als weißen flockigen Niederschlag ausfällt. Als Beleg führe ich folgenden Versuch an:

0,1 proz. Allantoinlösung ccm	Wasser ccm	Reaktion auf Zuatz weniger Tropfen Reagens	
		sofort	nach 24 Stunden
1	9	+ + + [1])	flockig abgesetzt
1	19	+ +	" "
1	39	+	" "
1	79	Spur	+
1	99	θ	Spur

Wie Harnstoff, verhalten sich allem Anscheine nach auch die Oxyproteïnsäuren, die wie der Harnstoff — bis auf die durch Bleiessig fällbare Alloxyproteïnsäure — nur durch Quecksilbersalze aus dem Harn gefällt werden, übrigens nach den Literaturangaben nur im Menschenharn in größerer Menge vorkommen dürften: Sie werden bloß durch konzentrierte (20 proz. bis heiß gesättigte) Lösungen, bzw. erst bei weiterem Sodazusatz niedergeschlagen, wobei außerdem die Fällung der Oxyproteïnsäure, der an Masse überwiegenden Substanz dieser Gruppe, selbst bei Gegenwart von freiem Alkali durch Natriumacetat gestört wird [2]).

Jedenfalls werden diese Säuren, auf deren große Bedeutung jüngst Ginsberg [3]) unter O. v. Fürths Leitung in einer ausführlichen Untersuchung eingegangen ist, bei der von mir befolgten Methode nicht mit

[1]) Die Intensität der Reaktion ist hier wie später durch die entsprechende Anzahl von Pluszeichen veranschaulicht.

[2]) St. Bondzýnski, St. Dombrowski und K. Panek, Zeitschr. f. phys. Chem. 46, 83 (1905).

[3]) Diese Beiträge 10, 411 (1907).

gefällt, da das (aus Harn) erhaltene Allantoin rein ist (vgl. unten). Eine Beimengung von Oxyproteïnsäuren müßte sich bei den stark auseinanderliegenden Stickstoffwerten beider Stoffe (Oxyproteïnsäuren 15 Proz., Allantoin 35,44 Proz.) insbesondere auch im Stickstoffgehalte des erhaltenen Allantoins äußern.

Die Anwendung dieses wenig konzentrierten Reagens läßt nicht nur jede auch spurweise Verunreinigung des gefällten Allantoins mit Harnstoff sicher vermeiden, sondern hat auch den Vorteil, daß bei der Unmöglichkeit, in der Reaktionsflüssigkeit durch unvorsichtigen Reagenszusatz höhere Konzentrationen an Mercuriacetat zu erzeugen, eine partielle Auflösung des einmal gebildeten Niederschlages auch bei reichlichem Überschuß von Reagens ausgeschlossen ist, wiewohl der Niederschlag in konzentrierten Mercuriacetatlösungen nicht völlig unlöslich ist.

Einen Vergleich über das Ausmaß der Allantoinfällung durch die verschiedenen Reagentien gestattet der folgende Versuch, in welchem der N-Gehalt von 5 ccm Allantoinlösung und der N-Gehalt der aus 5 ccm der gleichen Allantoinlösung erzielten gut ausgewaschenen Fällungen nach Kjeldahl ermittelt wurden.

Bezeichnung der Probe	N-Gehalt in Cubikcentimeter $^1/_{10}$ n-HCl
5 ccm Allantoinlösung 0,2 ad 50	4,9
5 ccm derselben Allantoinlösung mit Silbernitrat und MgO gefällt, silberfrei gewaschen (die Probe hat sich leicht geschwärzt)	4,7
Je 5 ccm derselben Allantoinlösung mit Mercurinitrat unter Neutralisation gefällt; Hg-frei gewaschen	4,85; 4,85
Je 5 ccm derselben Allantoinlösung mit Quecksilberacetat unter Zusatz von Natriumacetat gefällt. Nach 24 Stunden filtriert. Hg-frei gewaschen	4,9; 4,9

In reinen Allantoinlösungen läßt somit die Empfindlichkeit der Reaktion nichts zu wünschen übrig; anders verhält es sich bei Gegenwart einiger Salze, freier Säuren und von Harnstoff — hier ist die Reaktion unvollständig oder bleibt ganz aus.

Während sich der gewaschene und in Wasser suspendierte Niederschlag nur in freien Säuren, aber nicht in Salzlösungen auflöst, verschwindet der in einer Allantoinlösung durch das Reagens erzeugte Niederschlag sofort auf Zusatz einiger Tropfen starker Kochsalzlösung; das gleiche Verhalten zeigen übrigens auch die mit

Mercurinitrat erzeugten Allantoin-[1]) und Harnstoffniederschläge. Salpeter oder Natriumacetat lösen nicht. Ammonsalze hemmen die Reaktion ebenfalls, wie der folgende Versuch zeigt (desgleichen Sulfate).

1/10 proz. Allantoin ccm	Verdünntes Ammoniumacetat ccm	Reaktion auf einige Tropfen Reagens	
		sofort	nach 12 Stunden
1,0	9,0	+	flockig abgesetzt
1,0	19,0	θ	Trübung
1,0	39,0	θ	„

In gleicher Weise wie bei Zusatz von Kochsalz ist die Allantoinfällung auch durch Hinzufügen von viel Harnstoff (am besten in Substanz) wieder aufzulösen, doch ist sie noch in mindestens 1 proz. Harnstofflösung ebenso ausgiebig wie in Wasser. Als Beleg diene folgender Versuch.

1 proz. $\overset{+}{U}$-Lösung ccm	1/10 proz. Allantoin ccm	Reaktion auf Zusatz weniger Tropfen Reagens		
		sofort	nach 12 Stunden	nach 24 Stunden
4,5	0,5	+++	flockig	flockig abgesetzt
4,7	0,3	+	„	„ „
4,8	0,2	Spur	„	„ „
4,9	0,1	θ	Spur	„ „
5,0	—	θ	θ	θ

Gegenüber diesen die Reaktion hemmenden Stoffen gibt es aber auch naturgemäß solche im Harn, welche ebenso wie das Allantoin auch von dem verdünnten Reagens niedergeschlagen werden: die Phosphorsäure, freies Ammoniak und organische basische Stoffe, insbesonders auch Purinkörper.

Aus dem Gesagten ergibt sich also, daß der Harn von organisch-basischen Stoffen, Ammoniak, Phosphor-, Salz- und Schwefelsäure befreit und soweit verdünnt sein muß, und daß die Harnstoffkonzentration nicht viel mehr als 1 Proz. beträgt, ehe man ihn mit dem Reagens auf Allantoin prüft oder dieses quantitativ bestimmt. Außerdem gibt es aber noch ein einfaches Mittel, sich beim Ausbleiben der Reaktion davon zu überzeugen, ob wirklich

[1]) Das ist auch der Grund, warum nach Löwis Methode beim Zersetzen des Ag-Niederschlages durch Salzsäure die nachherige Fällung des Allantoins mit Mercurinitrat nur „bei sehr genauem Arbeiten“, d. h. bei Vermeidung jedes Überschusses an HCl, befriedigende Resultate gab.

kein Allantoin vorhanden oder dessen Fällung nur gehindert ist: man setzt zu der klar gebliebenen Probe einen Tropfen einer $^1/_{10}$ proz. frischen Allantoinlösung. Entsteht eine deutliche Trübung, so ist nichts versehen, im entgegengesetzten Falle sind noch nicht alle hemmenden Einflüsse beseitigt.

Auf diese Weise wurden viele der oben aufgezählten, die Reaktion hemmenden Stoffe entdeckt. Zum Beispiel: ein zersetzter, stark ammoniakalischer Hundeharn gab nach Ausfällen mit Mercuronitrat, Entfernen des überschüssigen Quecksilbers und Neutralisieren mit dem Reagens keine Fällung, aber auch bei Zusatz von Allantoinlösung zu der klar gebliebenen Probe erfolgte keine Reaktion. Wurde derselbe Harn aber nacheinander mit Phosphorwolframsäure, Blei- und Silberacetat behandelt, so erzeugte das Reagens nach Entfernung der Schwermetalle und Neutralisieren einen mächtigen Niederschlag. Andererseits blieb der Harn einer schwangeren Frau, in letzterer Weise behandelt, auf Zusatz des Reagens klar, jeder Tropfen zugesetzter Allantoinlösung erzeugte aber eine dauernde Trübung der Probe, als Beweis, daß wirklich kein Allantoin in dem untersuchten Harne vorhanden war.

Schließlich gelingt es aber durch Zusatz von fixem Alkali bis zur deutlichen alkalischen Reaktion wohl die meisten oder alle der angeführten Hemmnisse unwirksam zu machen. Bei Gegenwart von freiem Alkali hemmen weder Chloride noch Sulfate usw., dagegen fällt eventuell ein kleiner Teil Harnstoff und das Ammoniak mit aus. Zersetzt man den gewaschenen Niederschlag und verdampft zur Trockene, so verflüchtigt sich das Ammoniak vollständig. In der filtrierten Lösung des Rückstandes wird dann durch neuerlichen alleinigen Reagenszusatz nur Allantoin und zwar quantitativ niedergeschlagen.

Die Eigenschaft, durch verschiedene Salze gehemmt zu werden, kommt übrigens nicht nur der Mercuriacetat- und -nitrat-, sondern auch der Silberfällung des Allantoins zu. Auch diese erfolgt nicht in jeder Flüssigkeit quantitativ und kann beispielsweise durch Anwesenheit von viel Ammonsalzen (Acetat, Sulfat, Nitrat) ganz aufgehoben werden.

Die Befreiung des Harns von den genannten Stoffen kann in verschiedener Weise geschehen. In den meisten Fällen genügt es, organisch-basische Körper und Ammoniak durch Phosphorwolframsäure, Phosphor- und Schwefelsäure durch basisches Bleiacetat und das Chlor durch Silberacetat zu fällen, auf diese Weise werden alle Säuren durch Essigsäure ersetzt, von Metallen verbleibt in der Flüssigkeit nach Einleiten von Schwefelwasserstoff nur Natrium und Magnesium (Ca und K werden gleichfalls durch Phosphorwolframsäure niedergeschlagen) und gleichzeitig ist bei steter Verwendung aliquoter Filtratteile eine etwa fünffache Verdünnung der

Ausgangsflüssigkeit erzielt. — Bei Anwesenheit von viel Ammoniak habe ich dieses mit Vorteil oft als Tripelphosphat ausgefällt.

Das Ammoniak wurde durch Verreiben des Harns mit viel MgO frei gemacht, in die abgenutschte Flüssigkeit Magnesiumsulfat und einfach saures Natriumphosphat in Substanz reichlich eingetragen, in der Reibschale verrieben und mehrere Stunden stehen gelassen. Die alkalische Reaktion der Flüssigkeit ändert sich hierbei nicht, gleichwohl wird das Ammoniak völlig gebunden, der eigentümliche Geruch des alkalischen Harns verschwindet und mit Lackmuspapier läßt sich keine Ammoniakentwickelung mehr nachweisen. — Nach dem Absaugen wurde das Filtrat auch in diesem Falle natürlich nacheinander mit Blei- und Silberacetat gefällt. Nach Entfernung des Überschusses der Schwermetalle durch Schwefelwasserstoff reagierte die Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure meist gar nicht oder nur minimal.

Das von freier Essigsäure stark saure Filtrat von den Schwermetallsulfiden muß vor dem Zusatze des Reagens mit Natronlauge (aus Natrium) genau neutralisiert werden.

In einem so behandelten Harn ist die Allantoinfällung durch das Reagens ebenso ausgiebig wie in wässerigen Allantoinlösungen, d. h. quantitativ.

Der folgende, das Gesagte illustrierende Versuch wurde in einem zersetzten Hundeharn ausgeführt: Entfernung des Ammoniaks als Tripelphospat, Blei- und Silberfällung, Einleiten von H_2S, nach dem Filtrieren Ausblasen des überschüssigen H_2S. Vom Filtrate wurden zwei Proben zu 20 ccm (a und a_1) und zwei Proben zu 50 ccm (b und b_1) abgemessen und neutralisiert. 0,2 Allantoin wurden zu 25 ccm in Wasser gelöst, je 5 ccm dieser Lösung zu a_1 und b_1 zugesetzt und in zwei anderen Proben von je 5 ccm der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl ermittelt. a und a_1, b und b_1 wurden mit einem Überschuß an Reagens und Na-acetat in Substanz versetzt, die Niederschläge nach zwölf Stunden aufs Filter gebracht und quecksilberfrei gewaschen; dann wurde in allen vier Proben samt Filtern der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Die Resultate sind in Cubikcentimeter verbrauchten $^1/_{10}$ n-HCl angegeben:

5 ccm Allantoinlösung	10,0 ccm $^1/_{10}$ n-HCl	
5 „ „	9,95 „ „	
a ohne „	1,75 „ „	Differenz 10,0
a_1 mit 5 ccm Allantoinlösung	11,75 „ „	
b ohne Allantoinlösung	4,15 „ „	Differenz 10,0
b_1 mit 5 ccm Allantoinlösung . . .	14,15 „ „	

Es wurde also alles zugesetzte Allantoin niedergeschlagen. Daß die Fällung nur das Allantoin betrifft, ergibt sich nicht unmittelbar, da jeder Tierharn allantoinhaltig gefunden wurde und demgemäß ein nicht reagierendes Ausgangsmaterial nicht gegeben war, sondern erst aus dem Schmelzpunkt, Stickstoffgehalte und den Reaktionen des nach dem Zersetzen des Niederschlages erhaltenen Produktes.

Bei der Zersetzung der quecksilberfrei gewaschenen Allantoinniederschläge durch Schwefelwasserstoff wird das Quecksilbersulfid

zum großen Teil nicht ausgeflockt, sondern bleibt colloid gelöst, auch wenn man die Zersetzung bei Siedehitze vornimmt. Eine unmittelbare Filtration ist daher unmöglich, vielmehr ist es notwendig, die Flüssigkeit zur Trockne einzudampfen, wobei der größte Teil des Sulfids unlöslich wird, und das Allantoin in schönen weißen Kristallen anschießt. Nach dem Wiederauflösen muß man durch ein dichtes Filter eventuell mehrere Male filtrieren, um ein völlig klares, von Sulfid freies Filtrat zu erhalten. Beim Verdampfen desselben auf dem Wasserbade kristallisiert das Allantoin in wenig gefärbten, gut ausgebildeten Kristallen, welche eventuell nach einmaligem Umkristallisieren bei 230 bis 234° schmelzen und ohne Rückstand verbrennen.

Die so erhaltenen Allantoinkristalle lassen sich durch Behandlung der Lösung mit Tierkohle nicht entfärben, weil diese aus halbwegs konzentrierteren Lösungen Allantoin zurückhält, das sich nur äußerst schwierig wieder herauswaschen läßt.

Dagegen kann man die Kristalle mit wenig 3 proz. Wasserstoffperoxyd lösen und auf dem Wasserbade wieder zur Trockene bringen, wobei sie ganz farblos werden, ohne sich etwa partiell zu zersetzen (der Schmelzpunkt bleibt unverändert), übrigens aber an Gewicht nicht abnehmen.

Den Stickstoffgehalt des mit dem Reagens gefällten Produktes habe ich in Parallelproben in der Weise ermittelt, daß von dem zur Fällung verwendeten letzten Filtrate zwei gleiche Volumina abgemessen und gefällt wurden. Die eine Probe wurde dann zur Darstellung und Wägung des Allantoins benutzt und in dem gutgewaschenen Niederschlage der anderen Probe der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl ermittelt.

Die aus diesem berechnete Allantoinmenge zeigt gute Übereinstimmung mit der direkt durch Wägung gefundenen der anderen Probe. (Der Titrationsfehler beträgt ± 0,0002 bis 0,0004 g Allantoin.)

Tier	Datum 1907	Allantoin	
		direkt gewogen	aus dem Stickstoffgehalt des Niederschlages berechnet
Kaninchen	5. Juli	0,0037	0,0040
„	11. „	0,0261	0,0264
„	12. „	0,0118	0,0122
Hund	11. „	0,0225	0,0228
„	12. „	0,0606	0,0608
„	13. „	0,0240	0,0240
Katze	7. „	0,0169	0,0168

Durch Schmelzpunkt und Stickstoffgehalt ist demnach das erhaltene Produkt als Allantoin gekennzeichnet (wobei übrigens das Hauptgewicht auf den Schmelzpunkt zu legen ist, da bei dem Stickstoffgehalt von Allantoin (35,44 Proz.) und Harnstoff (46,7 Proz.) eine Beimengung des letzteren bis zu etwa 10 Proz. die Stickstoffwerte der oben angeführten kleinen Allantoinmengen nicht wesentlich, d. h. höchstens in der dritten Dezimale, zu beeinflussen imstande ist.

Die Reste der zur Kristallisation verwendeten Lösung wurden überdies zur reaktionellen Prüfung des abgeschiedenen Allantoins auf seine Reinheit benutzt. Phosphorwolframsäure, Silbernitrat, Bleiessig und Mercuronitrat dürfen in der Flüssigkeit eine Trübung oder einen Niederschlag nicht hervorrufen. Dagegen muß die Lösung mit Mercurinitrat sowie mit dem benutzten Allantoinreagens unter Bildung eines weißen, flockigen Niederschlages reagieren. Schließlich muß die klar gebliebene Silberprobe durch verdünntes NH_3 flockig gefällt werden, dieser Niederschlag im Überschuß von NH_3 löslich und durch weiteren Silberzusatz wieder ausfällbar sein.

Zum Schlusse sei die Methode, wie sie sich mir für den Harn am geeignetsten erwiesen hat, zusammenhängend beschrieben.

Hunde- und Kaninchenharn wurden zunächst verdünnt, Menschenharn wurde ohne vorausgehende Verdünnung verwendet. Im allgemeinen habe ich die 24 stündige Harnmenge von Kaninchen[1]) auf 150, die von Hunden auf 300 ccm, eventuell unter Verwendung der Käfigspülung, ergänzt. Die Verdünnung ist für die Vornahme der Phosphorwolframsäurefällung notwendig und schafft außerdem das nötige Volum für allfällige Analysen anderer Harnbestandteile (Harnsäure, Gesamt-N, N-Verteilung usw.). Für die Allantoinbestimmung wurden 100 ccm mit 10 ccm etwa 8 proz. Schwefelsäure versetzt, mit der gerade ausreichenden (durch Austasten vorher ermittelten) Menge 10 proz. Phosphorwolframsäurelösung (Merck) in einem Meßkolben von passender Größe gefällt und mit Wasser bis zur Marke ergänzt. Nach mindestens einstündigem Stehen wurde durch ein dichtes Faltenfilter in eine Schale filtriert und das klare meist tiefdunkel gefärbte Filtrat unter Verreiben so lange mit Bleicarbonat versetzt, bis keine Kohlensäureentwickelung mehr stattfand, und die Flüssigkeit nur schwach oder gar nicht sauer reagierte. Hierauf wurde von den ungelösten Bleisalzen auf der Nutsche scharf abgesaugt, ein rundes, möglichst großes Volum, des manchmal noch schwach blauen, aber stets neutralen Filtrates unter Vermeidung eines Überschusses, mit der durch Austasten ermittelten Menge Bleiessiglösung im Meßkolben gefällt und das fehlende Flüssigkeitsvolumen durch Wasser ersetzt. Das Filtrat von der Bleifällung wurde mit Schwefel-

[1]) Bei meinen mit Hafer gefütterten Tieren meist nicht mehr als 18 bis 30 ccm.

wasserstoff behandelt und das vom Bleisulfid mit der Luftpumpe vom gelösten H_2S befreit. Bei Anwesenheit von Chlor wurde dann ein aliquoter runder Teil, dieses von freier Essigsäure sauren Filtrates mit Silberacetatlösung wieder im Meßkolben gefällt und Wasser bis zur Marke nachgegossen. Das Filtrat vom Chlorsilber wurde in derselben Weise wie das von der Bleifällung mit H_2S und das vom ausgeschiedenen Silbersulfid mit Luft behandelt. In diesem essigsauren letzten Filtrate habe ich mich stets von der Vollständigkeit der vorgenommenen Fällungen durch Versetzen kleiner Proben mit Phosphorwolframsäure, Bleiessig und Silbernitrat überzeugt. Fielen diese Reaktionen absolut negativ aus, so wurde in zwei runden aliquoten Teilen nach vorausgegangener genauer Neutralisation mit chlorfreier (aus Natrium bereiteter) Natronlauge die Allantoinfällung mit Quecksilberacetat und Natriumacetat vorgenommen.

Das Reagens wird am besten so hergestellt, daß man käufliches essigsaures Quecksilber (Merck) zu 1 Proz. in Wasser löst, bis zur Sättigung reines Natriumacetat einträgt und mit Wasser soweit verdünnt, daß der Gehalt an Quecksilberacetat 0,5 Proz. beträgt. Die Vollständigkeit der Allantoinfällung wurde durch weiteren Reagens- bzw. Allantoinzusatz zu einer Filtratsprobe festgestellt. Nach mindestens einstündigem Stehen wurden die gebildeten Niederschläge auf Filter gebracht und bis zum Verschwinden der Fällung bzw. Gelbfärbung des Filtrates durch Schwefelnatrium mit Wasser gewaschen. Die eine Probe wurde dann der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl unterworfen. Der Niederschlag der anderen Probe wurde mit Wasser in ein Becherglas gespritzt und unter Erhitzen bis zum Sieden in die Flüssigkeit bis zur völligen Zersetzung des Niederschlages H_2S eingeleitet. Auf dem Wasserbade wurde hierauf zur Trockne verdampft, der Rückstand mit Wasser digeriert, quantitativ in einen kleinen Meßzylinder oder Kolben übertragen und das Volumen (meist 25 ccm, bei viel Allantoin 50 ccm) mit Wasser ergänzt. Die schließlich folgende Filtration wurde durch sehr dichtes Material vorgenommen und eventuell so lange wiederholt, bis das Filtrat ganz klar war. Ein rundes Volumen desselben wurde auf gewogener Schale verdampft, diese dann bei 100° getrocknet und gewogen. Der Rest des Filtrates diente zu den oben besprochenen Reinheits- bzw. Identitätsreaktionen. Waren die Allantoinkristalle gefärbt, so wurden sie bisweilen mit Wasserstoffsuperoxyd in der angegebenen Weise gebleicht. Entweder unmittelbar oder nach einmaligem Umkristallisieren wurde der Schmelzpunkt des erhaltenen Produktes bestimmt sowie eine kleine Probe desselben auf dem Platinblech verbrannt. Zum Schlusse wurden die ermittelten Werte für Allantoin und Allantoinstickstoff durch Multiplikation mit sämtlichen Volumzahlen (Harnvolumen, Volumen nach Zusatz von Phosphorwolframsäure nach Zusatz von Bleiessig, nach Zusatz von Silberacetat, Endvolumen nach Zersetzung der Allantoinfällung) und Division durch die Werte der verwendeten aliquoten Teile auf die gesamte Harnmenge umgerechnet. Die Bestimmung nimmt nicht mehr als 6 bis 12 Stunden in Anspruch.

Der Fehler, den die Verwendung aliquoter Filtratteile mit sich bringt (infolge der Vernachlässigung der Niederschlagsvolumina ist die berechnete Zahl größer als der wirkliche Wert), ist erfahrungsgemäß minimal, wenn nicht im Verhältnis zur Flüssigkeitsmenge sehr mächtige Niederschläge in Betracht kommen, und kann vernachlässigt werden; weit mehr ist die Ge-

nauigkeit des Resultates durch die zahlreichen Volummessungen gefährdet; ich habe daher auf diese die größte Sorgfalt verwendet, indem ich erstens nur nachgeeichte und übereinstimmende Pipetten und Meßkolben benutzt und andererseits in nach Tunlichkeit großen Volumina gearbeitet habe, wodurch nicht nur die Abmessungsfehler, sondern auch der durch Vernachlässigung der Niederschlagsvolumina gegebene Fehler geringer werden. Über etwaige andere Fehler der Methode, die jedoch nur unwesentlich sein können, da, wie oben erwiesen, die Fällung quantitativ ist, kann ich nichts aussagen, jedenfalls geht aber die Genauigkeit der schließlichen Zahlen nicht weit über die zweite Dezimale hinaus, da infolge der meist entstandenen fünffachen Harnverdünnung auch bei Inarbeitnahme einer ganzen Hälfte des Tagesharns die tatsächlich gemessenen Mengen nur den zehnten Teil der Gesamtmenge ausmachen, und demnach das Resultat im besten Falle zehnmal weniger genau als die Wägung oder Titration ist. In beiden Fällen müssen demnach die Endresultate um mindestens ± 0,002 bis 0,004 fehlerhaft sein. Es ist daher überflüssig, diese genauer als in zwei bis drei Dezimalen anzugeben. Damit entfallen alle Unterschiede, die die Größenordnung von ± 0,01 g Allantion pro die nicht überschreiten, für die physiologische Bewertung der Ergebnisse.

September 1907.

VIII.

Über den Nachweis der Glyoxylsäure und ihr Vorkommen im Menschenharn.

Von Dr. **E. Granström** (St. Petersburg).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Bei Prüfung von Menschenharn auf Glyoxylsäure mit Hilfe von Indollösung und konzentrierter Schwefelsäure erhielt Eppinger[1]) öfter eine positive Reaktion. Aus seinen mehr gelegentlichen Befunden glaubte er auf einen Zusammenhang von Glyoxylsäureausscheidung mit Alkoholzufuhr einerseits, mit Darmstörungen (Dysenterie, Typhus) andererseits schließen zu können. Indessen bedürfen diese Befunde um so mehr einer Nachprüfung, als sich bei Untersuchungen von Inada[2]), Dakin[3]), Schloss[4]) und O. Adler[5]) herausgestellt hat, daß die Indolglyoxylsäurereaktion in der von Eppinger benutzten Form nicht alle bei Untersuchung des Harns in Betracht kommenden Fehlerquellen vermeidet.

Als solche Fehlerquellen sind bis jetzt nachgewiesen:

1. Die Möglichkeit einer Verwechslung mit der Nitrosoindolreaktion bei Anwesenheit von Nitriten im Harne;

2. die Dunkelfärbung des Harns durch konzentrierte Schwefelsäure, wodurch der Nachweis geringerer Mengen Glyoxylsäure gänzlich unmöglich werden kann.

Die von E. Schloss angegebene Modifikation der Probe — vorheriger Säurezusatz zur Entfernung der salpetrigen Säure und Behandlung mit Tierkohle — ermöglicht es, diese Schwierigkeiten großenteils zu beseitigen und gestaltet zugleich den Gly-

---

[1]) Eppinger, diese Beiträge 6, 492.
[2]) Inada, ebenda 7, 473.
[3]) Dakin, Journal of biological Chemistry 1, 271.
[4]) Schloss, diese Beiträge 8, 445.
[5]) Adler, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 56, 231.

oxylsäurenachweis sehr empfindlich. Sie schließt aber eine weitere Fehlerquelle nicht aus, auf die ich im Laufe der später mitzuteilenden Harnuntersuchungen gestoßen bin, nämlich, daß Hexamethylentetramin (bzw. Formaldehyd) mit Indol in ähnlicher Weise reagiert wie Glyoxylsäure.

Ich habe daher die Methode des Glyoxylsäurenachweises einer neuerlichen Prüfung unterzogen.

Für die Überlassung von Glyoxylsäurelösung bin ich der Firma Kinzlberger u. Co. in Prag zu größtem Danke verpflichtet.

1. Verhalten verschiedener Aldehyde gegen einige Indolderivate.

Bei der Indolglyoxylsäureprobe kann die konzentrierte Schwefelsäure durch andere auch verdünnte Säuren ersetzt werden. Wenn man Indollösung mit Glyoxylsäure und konzentrierter Phosphorsäure, Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Trichloressigsäure oder Eisessig erwärmt oder bei 40° einige Stunden stehen läßt, so bildet sich ein schön roter Niederschlag; auch Chlorzink gibt die Reaktion unter denselben Versuchsbedingungen, doch viel langsamer und unvollständiger, es tritt in derselben Zeit nur eine Rotfärbung auf. Skatollösung und Glyoxylsäure gibt mit den genannten Säuren eine rotblaue Farbe; die Reaktion ist aber weniger empfindlich als beim Unterschichten mit konzentrierter Schwefelsäure.

Tryptophan und Glyoxylsäure gibt, mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet, einen grünblauen Ring; mit konzentrierter Phosphorsäure gibt es keine, mit konzentrierter Schwefelsäure nur bei großem Säureüberschuß eine schwache Reaktion.

Methylketol gibt bei der gewöhnlichen Versuchsanordnung keine Reaktion mit Glyoxylsäure und Mineralsäuren; mit der alkoholischen Lösung des Methylketols gelingt jedoch die Reaktion mit Glyoxylsäure und Mineralsäuren ebenso leicht, wie die Indolreaktion; man bekommt einen schönen dunkelvioletten Niederschlag.

Wie Glyoxylsäure reagieren auch andere Aldehyde mit Indolabkömmlingen unter Farbstoffbildung. C. Reichl[1]) hat schon 1890 Versuche mitgeteilt, aus denen hervorgeht, daß Aldehyde mit Indol, Skatol und Eiweiß bei Gegenwart von verdünnter Schwefelsäure und Ferrisulfat Farbenreaktionen geben. In jüngster Zeit haben Konto[2]) und Rosenheim[3]) nachdrücklich auf die Indol-

[1]) Reichl, Monatshefte f. Chem. 11, 155 (1890).
[2]) Konto, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 185.
[3]) Rosenheim, Biochemical Journal 1, 233.

	Indol und Schwefelsäure	Skatol und Schwefelsäure	Tryptophan und Schwefelsäure	Pepton und Schwefelsäure	Indol und Salzsäure	Methylketol und Salzsäure	Die Methylketolverbindung löst sich in Amylalkohol
Formaldehyd .	violett + +	rötlich gelb	braunblau	keine Reaktion	violetter Niederschlag +	violetter Niederschlag +	nicht
Acetaldehyd . .	orange +	gelblich, ins Grüne +	grauschwarz, ins Grüne +	braunschwarz +	orangefarbiger Niederschlag +	grüner Niederschlag +	tief grün
Chloral	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion	graurosa Flüssigkeit —	blauviolette Flüssigkeit —	kirschrot
Glyoxylsäure .	stark rot + +	rotviolett + +	blau +	blauviolett + +	roter Niederschlag +	rotvioletter Niederschlag +	violett
Glyoxal	orangerot + +	braun, schwach rötlich —	schwach graublau —	schwach graublau —	roter Niederschlag +	nicht untersucht	nicht untersucht
Propylaldehyd .	rosaorange +	braunrot	grün, in dicker Schicht schwarz	braunrot	braunroter Niederschlag +	schwarzer Niederschlag	tief braun
Brenztraubensäure	orangerot +	schön rot +	keine Reaktion	braunrot	braungelber Niederschlag	tiefrote Flüssigkeit	rot
Crotonaldehyd .	violett +	braunrot —	nicht untersucht	braun	violetter Niederschlag +	braunschwarzer Niederschlag	schwarz
Valeraldehyd .	rotorange +	braun	braun	braun	rosa Niederschlag +	schwarzer oder tiefblauer Niederschlag	kirschrot
Capronaldehyd	tiefrot +	orange +	nicht untersucht	braunrot	tief roter Niederschlag +	schwarzer Niederschlag	braunrot
Benzaldehyd . .	orange +	braunrot +	kirschrot + + oben schön blau	braunrot +	orangefarbiger Niederschlag +	braungrün, unten schwarz	rot
Salicylaldehyd .	tiefrot +	tief rot	nicht untersucht	braunrot	tief roter Niederschlag +	braunroter Niederschlag	rot

formaldehyd- bzw. die Tryptophanformaldehydreaktion aufmerksam gemacht. Dakin[1]) hat dann einen Vergleich der Farbenreaktionen von Formaldehyd einerseits und Glyoxylsäure andererseits mit Indol, Skatol und Tryptophan durchgeführt.

Die Farbenreaktionen einer Reihe von Aldehyden, sowie der Glyoxylsäure mit Indol, Methylketol, Skatol und Tryptophan, sowie Pepton (Wittepepton) sind aus nebenstehender Tabelle zu entnehmen.

Es empfiehlt sich, nur Spuren von Aldehyd zu nehmen, wenn man reinere Farbentöne erhalten will. Bei vielen von diesen Reaktionen resultieren schöne, charakteristische Farben, bei anderen sind sie trübe und verwaschen. Die ersteren Fälle sind mit +, die anderen mit — bezeichnet.

Mit Salzsäure wurden die Proben so ausgeführt, daß zu der Indolaldehydmischung ungefähr $\frac{1}{3}$ Volumen konzentrierter Salzsäure zugefügt und dann die Flüssigkeit einige Stunden im Brutschrank stehen gelassen wurde.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß alle untersuchten Aldehyde (außer Chloral) mit Indol und meistens auch mit seinen Derivaten unter Farbstoffbildung reagieren. Am schönsten und am charakteristischsten sind die Indolreaktionen, dann folgen die Färbungen der Methylketol- und Tryptophanverbindungen; das Skatol gab oft unreine, verwaschene Farbentöne. Mit Pepton gab Glyoxylsäure die beste Reaktion. Beim Glyoxal trat nur eine sehr schwache Reaktion auf. Von den anderen Aldehyden gaben gute Reaktionen Acetaldehyd und Benzaldehyd. Die Brenztraubensäure reagierte gut mit Indol, Skatol und Methylketol, gab keine Reaktion mit Tryptophan und Pepton. Lävulinsäure, Glykolsäure, Aceton und Diphenylketon gaben keine oder nur schwache Färbungen, denen ich keine Bedeutung zumessen möchte.

Über die Verbindungen des Indols und seiner Abkömmlinge mit Aldehyden liegen genauere Untersuchungen von E. Fischer und Wenzing[2]) vor. Sie haben farblose, kristallinische Verbindungen von Methylketol, Pr-1-Methylindol und Skatol mit Benzaldehyd durch Einwirkung von Chlorzink bei 100° dargestellt. Darin waren je zwei Methylindole mit einem Benzaldehyd verbunden.

Um mich über die Eigenschaften der bei der Indolreaktion entstehenden Farbstoffe zu orientieren, habe ich die gefärbten Verbindungen von Methylketol und Glyoxylsäure, Indol und Glyoxylsäure und Methylketol und Formaldehyd dargestellt.

Da Vorversuche gezeigt hatten, daß man bei einem Überschuß an Indol nicht immer einheitliche Substanzen erhält (der

[1]) Dakin, Journal of biological chemistry **2**, 289.

[2]) E. Fischer, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **19**, 2988; M. Wenzing, Liebigs Ann. **239**, 239.

Farbstoff löste sich nicht vollständig in Alkali), so wurde immer mit einem Überschusse an Glyoxylsäure bzw. Formaldehyd gearbeitet.

Methylketol und Glyoxylsäure.

Frisch destilliertes Methylketol wurde in konzentrierter Schwefelsäure gelöst, durch Verdünnen mit Wasser ausgefällt, auf dem Filter bis zur neutralen Reaktion des Waschwassers gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. 1,16 g dieses Präparates wurden in 50 ccm absoluten Alkohols und 100 ccm konzentrierter Salzsäure gelöst und dann mit 100 ccm 1 proz. Glyoxylsäurelösung 24 Stunden im Brutschrank stehen gelassen. Der reichliche dunkelrotviolette Niederschlag wurde abfiltriert, bis zu neutraler Reaktion des Waschwassers gewaschen, in möglichst wenig verdünnter reiner Kalilauge gelöst und durch Salzsäure wieder ausgefällt. Der Niederschlag fiel jetzt gallertig aus; er wurde abfiltriert, ausgewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Die erhaltene, sehr hygroskopische, nicht kristallinische Substanz ist löslich in Aceton, Äther, Methylalkohol, Äthylalkohol, Amylalkohol, Pyridin, weniger löslich in Essigäther, Petroläther, Chloroform, unlöslich in Benzol, Xylol, Toluol, Anilin. In Wasser löst sie sich sehr wenig, dagegen leicht in Alkali, und zwar mit orangegelber Farbe; in Säuren ist sie wenig löslich.

Bei langdauerndem Trocknen bei 95° scheint sich die Substanz etwas zu verändern, sie wird dunkler, löst sich dann in verdünnten Alkalien nur beim Erwärmen; nach dem Ansäuern fällt aber der Niederschlag von ursprünglicher Farbe wieder aus. In Amylalkohol löst sich die bei 95° getrocknete Substanz nur unter Erwärmen und mit brauner, nicht violetter Farbe.

Sie zersetzt sich zwischen 165 und 175°.

Die bei 50° über Schwefelsäure getrocknete Substanz ergab die Zusammensetzung:

	Gefunden		Berechnet für
	Präparat I	II	$C_{11}H_9NO_2$
C . . .	70,23	70,03	70,55
H . . .	5,74	6,03	4,85
N . . .	7,98 und 7,94	—	7,50

Es treten somit je ein Mol. Methylketol und Glyoxylsäure unter Wasseraustritt zusammen:

$$C_9H_9N + C_2H_2O_3 = C_{11}H_9NO_2 + H_2O.$$

Die entstandene gefärbte Verbindung hat schwach sauren Charakter und entspricht vermutlich der Formel $(C_9H_7N):CH.COOH$.

Indol und Glyoxylsäure.

0,5 Indol (Merck) wurden in 250 ccm heißem Wasser gelöst, mit einem Überschuß von Glyoxylsäure und mit 50 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und 14 Stunden im Brutschrank stehen gelassen. Der rote Niederschlag wurde auf dem Filter ausgewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Die Substanz ist löslich in Äther, Methylalkohol, Alkohol, Amylalkohol, Aceton, Essigäther, Petroläther, Chloroform, Pyridin; unlöslich in Xylol, Toluol, Benzol; wenig löslich in Wasser, etwas mehr in Säuren. In Alkali löst sie sich mit gelber Farbe und wird durch Ansäuern wieder als roter Niederschlag ausgefällt.

Die über Schwefelsäure bei 58° getrocknete Substanz gab bei der Analyse folgende Werte:

	Gefunden	Berechnet für $C_{18}H_{14}N_2O_2$
C . . .	73,45	74,44
H . . .	5,56	4,86
N . . .	9,88	9,67

Die Zahlen stimmen annähernd zu einem Kondensationsprodukt aus zwei Molekülen Indol und einem Molekül Glyoxylsäure, vermutlich $(C_8H_6N)_2 : CH . COOH$:

$$2\,C_8H_7N + C_2H_2O_3 = C_{18}H_{14}N_2O_2 + H_2O.$$

Methylketol und Formaldehyd.

4,0 g wie oben gereinigten Methylketols wurden in Alkohol und konzentrierter Salzsäure aufgelöst, mit überschüssiger 10 proz. Formaldehydlösung versetzt und in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden wurde der reichliche, braunviolette Niederschlag abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen, wobei der Niederschlag viel heller und schließlich braungrau wurde. Dieselbe Veränderung der Farbe beobachtet man, wenn man den braunvioletten Niederschlag mit Alkali benetzt; beim Ansäuern nimmt er wieder die dunkle, braunviolette Farbe an.

Die Substanz ist weder in organischen Lösungsmitteln, noch in Wasser, Säuren oder Alkalien löslich; bis 280° schmilzt sie nicht und zersetzt sich auch nicht merklich, wird nur etwas dunkler.

Die Analyse ergab für die

	bei 58°	bei 120° getrocknete Substanz	Berechnet für $C_{11}H_{11}NO$
C . . .	75,27 Proz.	75,96 Proz.	76,26 Proz.
H . . .	6,99 „	6,42 und 6,60 Proz.	6,40 „
N . . .	8,06 „	7,97 Proz.	8,10 „

Demnach haben sich je zwei Moleküle Formaldehyd unter Abgabe eines Moleküls Wassers an ein Molekül Methylketol angelagert:

$$C_9H_9N + 2CH_2O = C_{11}H_{11}NO + H_2O.$$

Wie aus den Analysen der erhaltenen Farbstoffe hervorgeht, verläuft die Kondensation der Aldehyde mit Indolderivaten recht verschieden. Die Annahme, daß die Glyoxylsäure mit den Indolkörpern nicht selbst, sondern nur ihr beigemengter oder aus ihr entstehender Formaldehyd[1]) reagiert, findet keine Stütze. Methylketol wenigstens gibt mit Glyoxylsäure ein durchaus anderes Kondensationsprodukt als mit Formaldehyd.

Wie die Untersuchungen von Feist[2]) lehren, erfolgt auch beim Pyrrol die Anlagerung von Aldehyden nicht immer in gleicher Weise. Meist treten zwei Pyrrole mit einem Aldehyd zusammen, beim Benzaldehyd wurde aber eine Verbindung mit nur einem Pyrrol erhalten.

2. Über das Vorkommen der Glyoxylsäure im Menschenharn.

Da die Farbenreaktionen der Glyoxylsäure zwar sehr empfindlich sind, aber die Verwechslung mit anderen gelegentlich vorkommenden Stoffen nicht sicher ausschließen, haben sich Eppinger und Dakin bemüht, zuverlässigere Nachweismethoden ausfindig zu machen. Beide empfehlen, die Glyoxylsäure nach Ansäuern mit Phosphorsäure abzudestillieren. Dakin konzentrierte überdies das Destillat nach Zusatz von etwas Calciumcarbonat bei 45° in vacuo, konnte aber auch dadurch einen Verlust an Glyoxylsäure nicht ganz verhindern. Einen Verlust an Glyoxylsäure bei der sauren Destillation hatte aber schon Inada beobachtet. Nach Schloss gibt sogar eine 1proz. Glyoxylsäurelösung im Destillat nur eine schwache Reaktion, und O. Adler fand nur bei Destillation von konzentrierten sirupösen Glyoxylsäurelösungen im Destillat Glyoxylsäure wieder. Ich war bei Versuchen, die Glyoxylsäure im Vakuum überzudestillieren, nicht glücklicher.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß reine Glyoxylsäurelösungen, die noch bei 10- bis 20fachem Verdünnen eine deutliche Indolreaktion gaben, mit Phosphorsäure schwach angesäuert wurden und dann bei 20 bis 25 mm Quecksilberdruck und einer 50° nicht übersteigenden Temperatur destilliert wurden, wobei die Dämpfe zuerst in der gut ge-

[1]) Vgl. Rosenheim, Biochem. Journ. 1, 233. — Vgl. Dakin, Journal of biolog. Chemistry 2, 295.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 1647.

kühlten Vorlage enthaltenes Wasser mit etwas aufgeschwemmtem Calciumcarbonat passieren mußten. Dann wurde das Destillat vorsichtig konzentriert. In derselben Weise wurde Harn destilliert, dem 10- bis 20mal mehr Glyoxylsäure zugesetzt war, als man nach der Methode von Schloss (Entfärben mit Tierkohle und Zerstörung der Nitrite mit Schwefelsäure) deutlich nachweisen konnte. Im Destillat wurde immer nur eine sehr schwache oder keine Indolreaktion gefunden. Der Rückstand gab aber fast immer noch eine deutliche, manchmal sogar starke Reaktion.

Der Nachweis der Glyoxylsäure durch Destillation ist also bei einer so niedrigen Konzentration, wie sie Harn und andere tierische Flüssigkeiten darbieten, nicht ausführbar. Dasselbe gilt nach Eppinger und Dakin von jenen Methoden, die auf der Überführung der Glyoxylsäure in Oxalsäure oder Allantoin und auf der Reaktion mit Phenylhydrazin beruhen.

Von mir unternommene Versuche, ein geeignetes Extraktionsmittel für Glyoxylsäure zu finden, schlugen fehl, da niedrige Alkohole, Äther, Acetessigester schon selbst oft Spuren von Glyoxylsäure enthalten, glyoxylsäurefreie Stoffe aber, wie Benzol, Toluol usw. die Glyoxylsäure zu wenig aufnehmen.

Hingegen wurde folgende Methode geeignet gefunden: Möglichst viel von dem die Indolprobe zeigenden Harn ($^1/_2$ bis 1 Liter) wird mit Tierkohle entfärbt und mit Kalkhydrat ausgefällt. Das von überschüssigem Kalk mit Kohlensäure befreite Filtrat wird mit Essigsäure neutralisiert und im Vakuum auf 100 bis 150 ccm eingedampft. Dann wird mit einem kleinen Überschuß von basischem Bleiacetat gefällt. (Manchmal ist ein kleiner Zusatz von Ammoniak zur vollständigen Fällung nötig.) Der Bleiniederschlag wird mit nicht viel Wasser gewaschen, mit Schwefelsäure zerlegt, das Filtrat mit Calciumcarbonat neutralisiert, in vacuo auf ein kleines Volumen eingedampft, der abgeschiedene Gips abgesaugt, mit wenig kochendem Wasser ausgezogen und die ganze Flüssigkeit im Vakuum auf ein kleines Volumen (30 bis 40 ccm) eingeengt. Darauf kann die Glyoxylsäure in der Flüssigkeit durch Überführung in Oxalsäure oder in die Amidoguanidinverbindung (Dakin) nachgewiesen werden. In letzterem Falle empfiehlt es sich, die Flüssigkeit im Vakuum bis zur Trockne einzudampfen, zur Entfernung von Chlorcalcium mit Alkohol zu extrahieren, den Rückstand in wenig heißem Wasser zu lösen und mit einer konzentrierten Lösung von Amidoguanidinnitrat aufzukochen. Nach 1- bis 2tägigem Stehen in der Kälte, manchmal erst in einer Kältemischung, kristallisiert die Amidoguanidinglyoxylsäure in schönen Nadeln vom Schmelzpunkt 155 bis 156^0 aus.

Das Verfahren gestattete noch 0,2 g zugesetzte Glyoxylsäure in 500 bis 1000 ccm Harn als Oxalsäure oder als Amidoguanidinglyoxylsäure nachzuweisen.

Die direkte Fällung des Harns mit Amidoguanidin, wie sie Dakin empfiehlt, ist weniger empfindlich: 0,2 g Glyoxylsäure zu 100 ccm Harn zugesetzt, wurden durch Amidoguanidin nicht gefällt; 0,3 g Glyoxylsäure in 100 ccm Harn gaben mit Amidoguanidin nur spärliche Kristalle.

Meine Harnuntersuchungen gingen vor allem dahin, festzustellen, ob der Glyoxylsäure eine pathognomonische Bedeutung zukommt. Im ganzen untersuchte ich den Harn von 302 Individuen mit den verschiedensten Krankheiten. Der Harn wurde von den medizinischen, chirurgischen und gynäkologischen Kliniken in Straßburg erhalten, wofür ich den Herren Professoren und ihren Assistenten auch an dieser Stelle meinen Dank ausspreche.

Ich verwandte möglichst frischen Harn; in den meisten Fällen war ich in der Lage, den Morgenharn noch an demselben Morgen zu untersuchen. Vor den Indolproben auf Glyoxylsäure wurden die Harne mit Tierkohle entfärbt und mit Stärkelösung, Jodkaliumlösung und Ansäuern mit Schwefelsäure auf etwaiges Vorhandensein von Nitriten geprüft. In den Fällen, wo Nitrit vorhanden war, wurde es durch Schwefelsäure nach der Angabe von Schloss zerstört und danach erst die Indolreaktion ausgeführt. Außer mit Indol wurde die Reaktion in derselben Weise mit Skatol gemacht, welchem allerdings ein geringerer Wert für den Nachweis der Glyoxylsäure zukommt, und dem schon Eppinger einen nur orientierenden Wert beilegte.

Die Indol- und Skatollösungen waren 0,2 proz.; davon wurde ungefähr 1 ccm zu 2 bis 3 ccm Harn zugesetzt und mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. Es empfiehlt sich, das Probierrohr nicht umzuschwenken, sondern einige Zeit ruhig stehen zu lassen, weil die Proben dann reinere Farbentöne annehmen. Bei der in dieser Weise ausgeführten Reaktion bleibt der Harn auch beim Fehlen der Glyoxylsäure nicht farblos, sondern es bildet sich meistens ein Ring, der nicht selten orange, oft braun oder grün, selten schwarz ist, der aber meistens die Glyoxylsäurereaktion nicht stört.

In den Fällen, wo die Indol- und Skatolproben positiv waren, wurde der Harn nach der oben beschriebenen Methode weiter verarbeitet.

Zur Untersuchung gelangten Harne

von 57 Kranken mit verschiedenen Formen der Tuberkulose;
„ 24 „ „ „ „ „ Herzinsufficienz;
„ 20 „ „ „ „ „ Nephritis chron.;
„ 20 „ „ Ileotyphus;
„ 12 „ „ Polyarthritis rheum.;

von 12 Kranken mit verschiedenen Formen der Lebercirrhose;
„ 9 „ „ akuter Pneumonie;
„ 9 „ „ Bronchitis chron.;
„ 8 „ „ verschiedenen Carcinomen;
„ 7 „ „ Pleuritis;
„ je 6 Kranken mit Diabetes mell., Angina und Neurasthenie;
„ „ 5 „ „ Leukämie (und Pseudoleukämie) und Arteriosklerosis;
„ „ 4 „ „ Enteritis, Gastritis, Ulcus ventriculi, Puerperium, Anaemia, Tabes dorsalis, Apoplexie, Ischias, Hysterie;
„ je 3 Kranken mit Influenza, Scarlatina, Sepsis, Cholecystitis, Arthritis chron., Dystrophia muscul. progr., Trigeminus-Neuralgie;
„ je 2 Kranken mit Adipositas, Achylia gastrica, Pleuritis purul., Febris herpetica, Morbus Basedowii, Morbus Addisonii, Lues cerebri, Chorea, Sclerosis multiplex, Polyneuritis;
„ je 1 Kranken mit Hypochlorhydrie, Gastroptose, Perityphlitis, Ikterus, Cystitis, Pneumothorax, Endocarditis, Myxoedem, Arthritis gonorrh., Asthma bronch., Arthritis urica und Bleiintoxikation, Tumor mediastini, Pleuritis et ascites (Neoplasma?), Tumor cerebri, Lumbago, Lysolvergiftung, Friedreichsche Krankheit, Psychose;
„ 1 Neugeborenen.

Eine scheinbar positive Indol- und Skatolreaktion, d. h. einen roten Ring an der Grenze der Schwefelsäure und des Harnes, fand ich in mehreren Fällen. In den meisten davon hing die Reaktion von dem Vorhandensein von Jod ab. In diesen Fällen wurde ein roter Ring bei der Unterschichtung mit konzentrierter Schwefelsäure auch ohne Indol oder Skatol erhalten, und der Harn gab die Jodreaktionen.

Eine positive Indolreaktion war auch in mehreren Cystitisharnen vorhanden, nur war der Ring nicht rein rot, sondern rotviolett. Bei der Bleifällung blieb die Substanz in Lösung und es wurde nachgewiesen, daß die Reaktion von dem den Kranken verabreichten Urotropin herrührte. Das Urotropin war in diesen Harnen nachweisbar 1. durch Überführung in Formaldehyd bei Destillation und Nachweis des Formaldehyds mit den bekannten Reagenzien[1]), und 2. durch Fällung mit Quecksilberchlorid, Auswaschen des Niederschlages, Destillieren mit verdünnter Schwefelsäure und Prüfung des Destillats auf Formaldehyd.

Außer bei den Jod oder Urotropin enthaltenden Harnen fand ich eine schwache positive Indol- und Skatolreaktion noch in Harnen von einer Typhusrekonvaleszentin, von einem Kranken, der an Carcinoma ventriculi litt, aber schon nach 2 Tagen starb, und, was ich hier mitanführen möchte, einmal im Harne eines normalen Hundes.

---

[1]) Zeitschr. f. analyt. Chem. **39**, 332; **40**, 161 und **42**, 451.

Der Harn des carcinomatösen Kranken konnte nicht genauer auf Glyoxylsäure untersucht werden, da die Methode der Bleifällung damals noch nicht genügend ausgearbeitet war. In den Harnen der Typhusrekonvaleszentin und des Hundes rührte die positive Indol- und Skatolreaktion nicht von Glyoxylsäure her, da die Substanz nicht von Blei gefällt wurde.

Nebenbei sei bemerkt, daß ich bei diesen Untersuchungen nur einmal auf Nitrite in frisch entleertem Harn gestoßen bin und zwar bei einem Falle von Cystitis.

Es ist nach diesem Ergebnis gegenüber Eppingers positiven Befunden fraglich, ob überhaupt jemals Glyoxylsäure im normalen oder pathologischen Harn auftritt. Jedenfalls wäre dies ein sehr seltenes Vorkommnis. Es stimmt dieses Ergebnis mit den Tierversuchen von Eppinger, Schloss und Adler überein, welche nach Verfütterung der Glyoxylsäure dieselbe im Harn nicht wiederfanden, woraus sich neuerlich ergibt, daß eingeführte Glyoxylsäure gewöhnlich so schnell im Tierkörper zerstört wird, daß man sie im Harn nicht wiederfindet.

Meine weiteren Untersuchungen gingen demgemäß dahin, Näheres über die Bedingungen dieser Zerstörung zu ermitteln. Ich berichte darüber in einer demnächst folgenden Mitteilung.

Kürzere Mitteilungen.

5. Über den Einfluß des o-Tyrosins auf die Homogentisinsäureausscheidung beim Alkaptonuriker.

Von **L. Blum.**

(Aus der medizinischen Klinik zu Straßburg.)

Im Anschluß an früher mitgeteilte Versuche[1]) über das Verhalten der drei Oxyphenylessigsäuren und des m-Tyrosins beim Alkaptonuriker soll im folgenden kurz das Resultat des schon damals in Aussicht gestellten Versuches mit o-Tyrosin mitgeteilt werden.

In zwei Versuchen brachte dasselbe ebensowenig wie das m-Tyrosin eine Vermehrung der Homogentisinsäureausscheidung zustande.

Homogentisinsäureausscheidung:

1.	6,2 g		4.	5,9 g	
2.	6,15 „		5.	5,8 „	⟶ 5 g o-Tyrosin
3.	5,8 „	⟶ 5 g o-Tyrosin	6.	5,95 „	

Die Einzelheiten über die erwähnten Versuche sowie über die Darstellung und Eigenschaften der bisher noch nicht bekannten Substanzen sollen in einer späteren ausführlichen Mitteilung erfolgen.

[1]) Verhandl. des Kongresses für innere Medizin 1907, S. 240.

Straßburg, 25. November 1907.

6. Über das Verhältnis von dysoxydablem Kohlenstoff zu dysoxydablem Stickstoff bei verschiedener Ernährung.

Von **K. Spiro.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Bei der außerordentlich komplexen Natur des Harns, dessen einzelne Bestandteile wir nicht einmal vollständig kennen, sind wir, wenn wir über seine biologische Bedeutung etwas aussagen wollen, auf indirekte Methoden angewiesen. Der erste, der dies Ziel in systematischen Untersuchungen verfolgte, war E. Pflüger, der durch seine Schüler L. Bleibtreu, F. Meyer und B. Schöndorff namentlich die elementare Zusammensetzung des Harns, speziell auch das Verhalten von Harnstoff zu Gesamtstickstoff, bei gemischter und Fleischnahrung feststellen ließ [1]. Später hat dann M. Pfaundler auf F. Hofmeisters Veranlassung [2] für das Studium der Verteilung des Stickstoffs im Harn eine genaue und einfache Methodik ausgearbeitet, mit der er z. B. bei Phosphorvergiftung ein Abweichen von der Norm konstatieren konnte.

Zur Charakterisierung der Harnzusammensetzung kann man auch, wie in der vorhergehenden Mitteilung [3] ausgeführt wurde, das Verhältnis C:N im Harn verwenden. Stellen wir die bisher bei beiden Methoden gefundenen Tatsachen für physiologische Verhältnisse zusammen, so ergibt sich, daß der relative Harnstoffgehalt (bezogen auf Gesamt N) bei Eiweißnahrung am größten, bei Kohlehydratnahrung am kleinsten ist, während umgekehrt das Verhältnis C:N bei Kohlehydratnahrung am größten, bei Eiweißnahrung am kleinsten gefunden wird.

Da nun das Verhältnis C:N in keinem anderen Bestandteile des normalen Harns so niedrig ist wie im Harnstoff, konnte man zu der Annahme neigen, daß der niedrige Wert C:N im Fleischharn nur durch den hohen Harnstoffwert bedingt sei, daß also, abgesehen von dem mit der Nahrung wechselnden Gehalt an diesem Körper, die Zusammensetzung des Harns auch bei verschiedener Nahrung dieselbe sei, was a priori, da wir es im Harn mit einem Exkret zu tun haben, teleologisch nicht unwahrscheinlich war.

Die in meiner letzten Arbeit gegebenen Zahlen erlauben darüber ein Urteil, da in ihnen gleichzeitig außer dem Gesamt-N der Kohlenstoffgehalt (durch Elementaranalyse des nicht eingetrockneten Harns) und der Harnstoffgehalt bestimmt wurden. Die Betrachtung der beiden Verhältnisse $\frac{\text{Harnstoff-N}}{\text{Gesamt-N}}$ und $\frac{C}{N}$ bei verschiedener Nahrung sprechen

---

[1]) Eine Übersicht der Literatur siehe bei Schöndorff, Pflüg. Archiv **115**.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **30**.

[3]) Diese Beiträge **10**, 277. Daselbst Hinweise auf die Literatur.

gegen die obige Vermutung. Legen wir der Berechnung die beiden am meisten auseinander liegenden Zahlen (bei Kohlehydrat- und bei Fleischfütterung) zugrunde: Bei Kohlehydratfütterung entsprechen 21,4 Teilen Rest-N 44,53 Teile nicht in Form von Harnstoff vorkommenden, sogenannten „dysoxydablen" C; bestände dasselbe Verhältnis bei Eiweißnahrung, so würden den nicht in Form von Harnstoff vorhandenen 9,2 Teilen Rest-N 19,15 Teile C entsprechen, wir hätten also auf 100 Teile N insgesamt 58,07 Teile C, während 60,05 beobachtet wurden.

Ebenso ist das Verhältnis $\frac{\text{dysoxydabler C}}{100\ \text{N}}$ auch bei N-freier Nahrung sehr verschieden: Für Fett = 36,1, für Kohlehydrat = 44,0 (während es bei Fleischnahrung 20,9, bei Hunger 42,2 beträgt).

Wir sind aber nicht berechtigt, den Harnstoff als alleiniges physiologisches Endprodukt zu bezeichnen, vielmehr müssen wir auch das Ammoniak berücksichtigen. Bei der Mitteilung meiner Ammoniakzahlen ist mir leider ein Versehen unterlaufen, indem ich die Werte um eine Dezimale zu klein angegeben habe. Es betrug also der NH_3-Gehalt bei Fleischfütterung 4,98 Proz., bei Fettfütterung 3,95 Proz., bei Kohlehydratfütterung 3,2 Proz. und bei Hunger 3,62 Proz. Nennen wir den Teil des im Harn ausgeschiedenen Kohlenstoffs und Stickstoffs, der nicht in Form von Harnstoff oder Ammoniak erscheint, dysoxydablen C bzw. dysoxydablen N, so erhalten wir für deren Verhältnis bei

Fleischfütterung:		Fettfütterung:	
1 : 4,768	1 : 7,067	1 : 2,74	1 : 2,78
1 : 4,501	1 : 4,278	1 : 2,94	1 : 3,25
im Mittel:	1 : 5,153	im Mittel:	1 : 2,93
Kohlehydratfütterung:		**Hunger:**	
1 : 2,35	1 : 2,42	1 : 2,26	1 : 2,42
1 : 2,41	1 : 2,50	1 : 2,35	1 : 2,52
im Mittel:	1 : 2,42	im Mittel:	1 : 2,38

Wie man sieht, ist das Verhältnis bei Eiweißfütterung wesentlich verschieden von dem bei anderer Fütterung. Wir haben einen etwa um das Doppelte höheren Koeffizienten, d. h.: Die Zusammensetzung des Harns bei wechselnder Nahrung ist verschieden, es erscheinen bei reiner Fleischnahrung relativ kohlenstoffreiche Körper im Harn. Sie werden also nicht in dem Umfang verbrannt wie die intermediären Produkte bei Kohlehydrat- und Fettnahrung.

Wenden wir diesen Befund auf die Beobachtungen am hungernden Tiere an, so sieht man an dem hierbei gefundenen Koeffizienten, daß meine Tiere wesentlich auf Kosten ihres Kohlehydrat- und Fettbestandes gelebt haben, bzw. ihr eigenes Eiweiß nicht so verbrauchten, wie sie es mit dem reichlich zugeführten fremden Eiweiß taten. Ob es sich hier um eine Differenz des Eiweißmaterials oder um einen Regulationsprozeß handelt, können vielleicht Versuche mit längeren Hungerperioden entscheiden.

---

7. Über die chemische Stellung der Pankreasnucleïnsäure (Guanylsäure).

Zweite Mitteilung.

Von Dr. **Otto von Fürth,**
a. ö. Professor für medizinische Chemie an der Wiener Universität,

und cand. med. **Ernst Jerusalem.**

Aus der Mitteilung von I. Bang „Zur Charakteristik der Guanylsäure[1]“ entnehmen wir, daß unsere Ansichten von denjenigen, zu welchen Bang nunmehr hinsichtlich der chemischen Stellung der Pankreasnucleïnsäuren gelangt ist, keineswegs so sehr abweichen, als es Bangs polemischen Ausführungen nach auf den ersten Blick scheinen dürfte.

Hammarsten[2]) hat seinerzeit ein Nucleoproteïd aus dem Pankreas nach folgendem Verfahren dargestellt: „Wenn die fein zerschnittene oder zerhackte, vorher rein präparierte frische Pankreasdrüse von Rindern in Wasser rasch gekocht wird, so erhält man leicht ein ganz klares, blaßgelb gefärbtes Filtrat, in dem man nach dem Erkalten durch Zusatz von Salzsäure bis zu 1 bis 2 Prom. oder von Essigsäure 5 bis 10 Prom. einen reichlichen weißflockigen Niederschlag erhält. Durch wiederholtes Auflösen in Wasser mit Hilfe von möglichst wenig Alkali und Wiederausfällen mit einer Säure kann dieser Niederschlag, welcher aus dem Proteïde besteht, gereinigt werden.“

Durch Spaltung dieses Nucleoproteïds hat nun Bang[3]) die Guanylsäure (β-Guanylsäure) zuerst dargestellt und in einer Ausbeute von nur etwa 20 g aus 1200 Stück Ochsenpankreas gewonnen.

Einige Jahre später hat nun aber Bang[4]) gemeinsam mit Raaschou ein neues Verfahren ermittelt, um die Guanylsäure in viel bequemerer Art und unvergleichlich besserer Ausbeute zu gewinnen. Während die Guanylsäure früher nur aus jenem Anteile des Pankreasgewebes dargestellt wurde, welcher dem in siedendem Wasser löslichen Nucleoproteïde Hammarstens entspricht, und die Hauptmenge der Pankreasproteïde dabei von der Verarbeitung zu Nucleïnsäure aus-

---

[1]) Diese Beiträge **11**, 76.

[2]) O. Hammarsten, Zur Kenntnis der Nucleoproteïde. ZS. f. physiol. Chemie **19**, 20 (1894).

[3]) Bang, l. c. Diese Beiträge **10**, 174.

[4]) Bang und Raaschou, l. c. Diese Beiträge **10**, 174.

geschlossen geblieben war, wurde nunmehr das ganze Pankreas durch Wirkung erwärmter Natronlauge verflüssigt und in die Verarbeitung einbezogen. Das dieser Darstellung zugrunde liegende Prinzip war folgendes: Zerkleinertes Ochsenpankreas wurde mit 1 proz. Natronlauge angerührt und die Mischung 24 Stunden lang erwärmt, bis die Lösung dünnflüssig geworden war. Dieselbe wurde nunmehr mit Essigsäure schwach angesäuert, filtriert, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, stark konzentriert und mit Alkohol gefällt. Die so erhaltene Nucleïnsäure (α-Guanylsäure), welche durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol gereinigt werden konnte, sollte sich nun, Bangs Angaben zufolge, von der früher beschriebenen β-Guanylsäure lediglich durch den Mehrgehalt einer Glycerinpentosegruppe unterscheiden (vgl. die beiden Formelbilder auf S. 179 der Abhandlung von Bang und Raaschou) und durch Einwirkung von Alkali in dieselbe übergeführt werden.

Dieses Präparat (α-Guanylsäure) umfaßt nun, seiner Darstellungsweise entsprechend, offenbar die Gesamtmenge der im Pankreas enthaltenen Nucleïnsäuren, etwa mit Ausnahme der β-Guanylsäure. Denn alle Nucleïnsäuren geben ja in Wasser lösliche Alkalisalze und können durch Alkohol gefällt werden. Alle, mit Ausnahme der β-Guanylsäure, sind durch Essigsäure nicht fällbar, daher dürfte nur die β-Guanylsäure beim Ansäuern der alkalischen Pankreaslösung mit Essigsäure ausgefallen und der weiteren Verarbeitung entgangen sein.

Auf diese α-Guanylsäure bezogen sich nun unsere Einwände gegen die Existenz der Guanylsäure. Dieselben basierten auf der Feststellung, daß die Hauptmenge der Pankreasnucleïnsäure oder, genauer ausgedrückt, des nach Neumanns Verfahren dargestellten Nucleïnsäurengemenges (vorausgesetzt, daß es sich um mehrere chemische Individuen handelt) durchaus den Charakter der Thymonucleïnsäuren trägt.

Wenn nun Bang den Vorwurf gegen uns erhebt, daß wir unsere Ergebnisse von der α-Guanylsäure auf die β-Guanylsäure übertragen haben, so ist dieser Vorwurf vollkommen unberechtigt, denn diese Übertragung basierte ja eben auf Bangs eigenen, sehr bestimmt lautenden Angaben, denen zufolge die beiden Guanylsäuren sich voneinander nur durch eine Glycerinpentosegruppe unterscheiden und durch einfache Alkaliwirkung ineinander übergeführt werden können. Es war daher nicht nur statthaft, sondern selbstverständlich, daß wir zum Zwecke des Studiums der Guanylsäure das neuere Darstellungsverfahren Bangs gewählt haben, welches, Bangs eigenen Angaben zufolge, den älteren Methoden gegenüber einen erheblichen Fortschritt bedeutete und den großen Vorteil einer unvergleichlich besseren Ausbeute bot.

Ebenso selbstverständlich aber ist es, daß die Berechtigung einer Übertragung unserer Befunde von der α-Guanylsäure auf die β-Guanylsäure in demselben Augenblicke entfällt, wo Bang aufgehört hat, an der Annahme einer nahen Verwandtschaft und eines engen Zusammenhanges dieser beiden Substanzen festzuhalten. Wir glauben annehmen zu dürfen, daß dies gegenwärtig der Fall ist, da ja offenbar eben die

Erkenntnis einer weitgehenden Verschiedenheit der α-Guanylsäure und der β-Guanylsäure jenem gegen uns erhobenen Vorwurfe zugrunde liegt. Auch spricht sich jetzt Bang selbst ausdrücklich dahin aus, „daß das Pankreas neben der bloß Guanin enthaltenden Guanylsäure noch andere Nucleïnsäuren enthält, wie sie ja in der Tat von Levene u. a. beschrieben worden sind".

Falls wir also Bang recht verstanden haben und er jetzt einerseits die Existenz einer Thymonucleïnsäure im Pankreas zugibt (und aus einer solchen bestand das als α-Guanylsäure beschriebene Präparat zum größten Teile), andererseits aber an der nahen Verwandtschaft der beiden Guanylsäuren nicht mehr festhält, entfällt für uns selbstverständlicherweise jeder Grund, die Existenz der aus dem Hammarstenschen Nucleoproteïde nach Bangs älterer Methode gewonnenen β-Guanylsäure, die wir niemals dargestellt und studiert haben, anzuzweifeln. Ein Satz auf S. 186 unserer ersten Abhandlung ist also dahin zu berichtigen, „daß es sich empfehlen dürfte, die Bezeichnung α-Guanylsäure (nicht Guanylsäure im allgemeinen), als auf einer irrigen Annahme basierend, fallen zu lassen". Die β-Guanylsäure, also die Guanylsäure im Sinne von Bangs älteren Untersuchungen, wird durch diese Feststellung nicht berührt.

Durch die neuen, die Konstitution der Inosinsäure betreffenden Untersuchungen von Neuberg und Brahm[1]), sowie durch diejenigen Bauers[2]) aus dem Laboratorium Hofmeisters, ist der Beweis erbracht worden, daß eine aus je einem Molekül Phosphorsäure, Pentose und Hypoxanthin zusammengesetzte kristallisierbare Substanz in einem Organextrakte tatsächlich vorkommt. Die Guanylsäure wäre demnach anscheinend als ein Analogon der Inosinsäure anzusehen, welche an Stelle des Hypoxanthins eine Guaningruppe enthält, und dürfte Bangs ältere Vorstellung hinsichtlich der Beschaffenheit derselben nur in bezug auf die Beteiligung des Glycerins an ihrem Aufbau zu berichtigen sein. Trotzdem wir die β-Guanylsäure, wie gesagt, nicht in Händen gehabt haben, scheinen uns die für ihren Glyceringehalt angeführten Reaktionen nicht eindeutig und wenig beweisend zu sein. Übrigens wird ja der von Bang in Aussicht gestellte direkte Versuch wohl auch über diese Frage Gewißheit erbringen, und spricht Bang selbst die Ansicht aus, „daß die Anwesenheit der Glyceringruppe für die Stellung der Guanylsäure innerhalb der Nucleïnsäuren nicht von ausschlaggebender Bedeutung ist."

Wir halten die genaue Untersuchung von nach Art der Inosinsäure und Guanylsäure konstituierten einfachen Bruchstücken der Nucleoproteïdmoleküle, die sich bei geeignetem Vorgange vielleicht nicht nur aus Muskeln und aus dem Pankreas, sondern auch aus anderen Organen

---

[1]) C. Neuberg und B. Brahm, Über die Inosinsäure. Biochem. Zeitschr. 5, 438 (1907).

[2]) F. Bauer, Über die Konstitution der Inosinsäure und die Muskelpentose. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.) Diese Beiträge 10, 345.

isolieren lassen würden, für um so wichtiger und dankenswerter, als die Untersuchung der kompliziert gebauten Nucleïnsäuren durch die Schwierigkeit, ihre chemische Einheitlichkeit sicherzustellen, sehr erschwert wird. Es ist nunmehr in allen Organen, auch in der Milchdrüse[1]) und im Pankreas, welche eine Ausnahmestellung einzunehmen schienen, die Existenz typischer „Thymonucleïnsäuren" sichergestellt worden, und es fragt sich, ob es denn nicht zweckmäßig wäre, die Bezeichnung „Nucleïnsäure" für diese Thymonucleïnsäuren zu reservieren und für einfachere Verbindungen von der Art der Inosinsäure und Guanylsäure eine andere Bezeichnungsweise zu wählen, um so mehr, als diese letzteren durch ihren Gehalt an hydrolytisch abspaltbarem Zucker und durch das Fehlen von Pyrimidinderivaten in ihrem Molekül zweifellos eine chemische Sonderstellung einnehmen.

Schließlich sei es uns noch gestattet, einen weiteren von Bang gegen uns erhobenen Vorwurf zu widerlegen.

„. . . Ebenso angreifbar", schreibt Bang, „ist die Versuchsanordnung, mit der die Verfasser (Fürth und Jerusalem) das Adenin im Guaninfiltrate bestimmen. Sie gehen dabei von der Vorstellung aus, daß das Guanin durch Ammoniak quantitativ gefällt wird und sehen den der Fällung entgangenen Anteil, soweit er durch ammoniakalisches Silber niedergeschlagen wird, schlechtweg für Adenin an . . .

. . . Es darf also der der Ammoniakfällung entgangene Anteil der Purinbasen nicht ohne nähere Untersuchung als Adenin angesprochen werden."

Wie sehr uns Bang Unrecht tut, wenn er bei uns die Unkenntnis der letzteren zweifellos richtigen Tatsache voraussetzt, ist durch einen Blick in die unter der Leitung des einen von uns ausgeführte, die Milchdrüsennucleïnsäure betreffende Arbeit von Löbisch zu ersehen[2]). Wenn wir also, trotzdem uns obige Tatsache sehr wohl bekannt war, die im Filtrate der Ammoniakfällung enthaltene Base dennoch als Adenin bezeichnet haben, so geschah es, weil die Probe mit Metaphosphorsäure (Pohl), welche selbst sehr kleine Guaninmengen anzeigt[3]),

[1]) W. Löbisch, Über Nucleïnsäure-Eiweißverbindungen unter besonderer Berücksichtigung der Nucleïnsäure der Milchdrüse. Diese Beitr. 8, 191 (1906).

[2]) „Ich möchte es nicht unterlassen", schreibt Löbisch (diese Beitr. 8, 197), „eine Beobachtung mitzuteilen, die darauf hinweist, daß bei Bestimmung des Guanins in der üblichen Weise durch einfache Ammoniakfällung leicht die tatsächlich vorhandene Guaninmenge zu gering bewertet werden kann: ein Quantum Milchdrüsennucleïnsäure wurde mit 10proz. Salzsäure einige Stunden erhitzt und die Zersetzungsflüssigkeit vorsichtig mit einem Überschuß von Ammoniak gefällt. Aus dem Filtrate konnte der durch Ammoniak nicht unmittelbar fällbare Rest der Purinkörper durch Zusatz von Silbernitrat gefällt werden. Der Silberniederschlag wurde mit Salzsäure zerlegt. In dem Filtrate vom Chlorsilber erzeugte nun Ammoniak neuerlich einen Niederschlag, der sich durch die Murexidreaktion als Guanin erwies. Es wurde nun der Rest der Purinkörper wieder mit Silbernitrat gefällt, der Niederschlag wiederum wie vorhin behandelt und so noch eine dritte Guaninfraktion erhalten."

[3]) Vgl. Hammarsten, 6. Aufl., S. 161: „Von Pikrinsäure wie auch von Metaphosphorsäure werden selbst sehr verdünnte Guaninlösungen gefällt."

im Ammoniakfiltrate tatsächlich negativ ausgefallen war. Wenn wir uns aber mit dieser einfachen Probe begnügt und nicht noch weitere Versuche in dieser Richtung ausgeführt haben, so taten wir dies, weil durch die sehr zahlreichen und sorgfältigen Versuche von Kutscher, Inoko, Levene & Stooky, Jonas & Whipple, Lohmann und M. Schenk (Literatur, l. c., diese Beitr. 10, 176 u. 184) der volle und zweifellose Beweis längst erbracht war, daß bei Spaltung der Pankreasnucleoproteïde neben Guanin noch andere Purin- oder Pyrimidinderivate auftreten. Da nun das als α-Guanylsäure bezeichnete Präparat die Gesamtmenge der bei Spaltung der Pankreasnucleoproteïde auftretenden Nucleïnsäuren (etwa mit Ausnahme der durch Essigsäure fällbaren β-Guanylsäure) umfaßt, unterliegt es keinem Zweifel, daß dieses Präparat neben Guanin auch noch andere Substanzen basischer Natur enthalten hat.

Für die aus dem Hammarstenschen Nucleoproteïd gewonnene β-Guanylsäure haben wir dagegen, wie wir ausdrücklich hervorheben wollen, nunmehr keinen Grund, die Angabe Bangs, sie enthalte von basischen Substanzen nur Guanin, anzuzweifeln. Für diese, aber auch nur für diese Substanz ist daher die Bezeichnung Guanylsäure zutreffend.

Das Pankreasgewebe enthält sonach, wie aus den nunmehr vorliegenden Erfahrungen hervorgeht und wie wir noch einmal zusammenfassend bemerken wollen, Nucleoproteïde verschiedener Art. Die Hauptmenge derselben liefert, nach Neumanns Prinzip verarbeitet, „Thymonucleïnsäure", die sich von den aus anderen Organen nach dem gleichen Verfahren gewonnenen Nucleïnsäuren dieser Art nicht in auffallender Weise unterscheidet. Außerdem liefert das Pankreas noch ein Nucleoproteïd besonderer Art, welches durch seine Löslichkeit in heißem Wasser ausgezeichnet ist (Nucleoproteïd Hammarstens). Dieses gibt nach Bang bei der Spaltung Guanylsäure, welche durch ihren einfachen Aufbau aus Phosphorsäure, Guanin und Pentose von anderen Nucleïnsäuren unterschieden ist. Nur auf diese Substanz, nicht aber auf das früher als α-Guanylsäure bezeichnete Präparat darf die Bezeichnung Guanylsäure mit Recht angewandt werden.

Nachschrift bei der Korrektur.

In einem kürzlich erschienenen Aufsatze hat H. Steudel (Über die Guanylsäure aus der Pankreasdrüse, Zeitschr. f. physiol. Chemie 53, VI, 539, ausgegeben am 22. November 1907) Bangs Angaben einer neuerlichen experimentellen Nachprüfung unterzogen. Er gelangt zu Resultaten, die mit unserer oben begründeter Auffassung des Gegenstandes in allen Punkten übereinstimmen; er vermißt das Glycerin auch in der nach Bangs älterem Verfahren dargestellten Guanylsäure. Die Sachlage erscheint also nunmehr definitiv klargestellt.

Beiträge zur Chemischen Physiologie und Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

XI. Band 5. und 6. Heft

(Ausgegeben Februar 1908)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1908

Inhalt des 5. und 6. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

IX.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

Erste Mitteilung.

Das Verhalten der normalen d-l-α-Aminosäuren der Fettreihe im Organismus des Hundes.

Von **E. Friedmann.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Die Untersuchungen von Wöhler[1]), Buchheim[2]) und seinen Mitarbeitern und von Schotten[3]) haben gezeigt, daß die Säuren der Essigsäurereihe [Essigsäure[4]), Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure] als Salze dem tierischen Organismus zugeführt, vollständig verbrannt werden. Über die chemischen Vorgänge, die sich bei diesem Abbau der Karbonsäuren abspielen, liegen keine Erfahrungen vor, die einen Einblick in die Natur der im Organismus in Betracht kommenden Reaktionen gestatten.

Die ersten Beobachtungen, aus denen hervorgeht, daß der physiologische Abbau der Karbonsäuren, wie ich der Kürze halber den Abbau der Karbonsäuren im tierischen Organismus bezeichnen möchte, bestimmten Gesetzmäßigkeiten unterworfen ist, finden sich in der Arbeit von Knoop[5]) „Über den Abbau der aromatischen Fettsäuren im Tierkörper". Knoop stellte hier die wichtige Tatsache fest, daß die aromatischen Fettsäuren mit gerader Kohlen-

---

[1]) Zitiert nach A. Heffter, Ergebn. d. Physiologie 4, 215 (1905).
[2]) Ebenda.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 375.
[4]) Pohl, Arch. f. exp. Path. 37, 413.
[5]) Diese Beiträge 6, 150.

stoffseitenkette (Phenylessigsäure, Phenylbuttersäure, Phenylcapronsäure) als Phenacetursäure, und die mit ungerader Kohlenstoffseitenkette (Benzoesäure, Phenylpropionsäure, Phenylvaleriansäure) als Hippursäure zur Ausscheidung gelangen. Die Deutung, die Knoop [1]) den Ergebnissen seiner Untersuchung gibt, formuliert er in folgenden Worten: „es scheinen mir, wenigstens für die gesättigten, normalen, endständig phenylsubstituierten Fettsäuren, soweit der gegenwärtige Stand der synthetischen Chemie überhaupt eine Prüfung zuläßt, alle gefundenen Tatsachen die Berechtigung einer Annahme des Oxydationsangriffes in β-Stellung zu erlauben, ja als die einzig mögliche Erklärungsform für die Versuchsergebnisse hinzustellen".

Von rein chemischen Gesichtspunkten setzt sich aber die Annahme eines Oxydationsangriffes in β-Stellung zur Carboxylgruppe in Widerspruch zu den Tatsachen, die über Oxydation, Substitution und Kondensation von normalen Fettsäuren bekannt sind, da nur die Wasserstoffatome des α-Kohlenstoffs sich als reaktionsfähig erwiesen haben und keine Beobachtnng vorliegt, daß die Wasserstoffatome am β-Kohlenstoffatom überhaupt reaktionsfähig sind. Es kann daher die Annahme eines Oxydationsangriffes in β-Stellung zur Carboxylgruppe nicht als eine chemische Erklärung der von Knoop ermittelten Gesetzmäßigkeiten beim Abbau der aromatischen Fettsäuren angesehen werden, wenigstens nicht in dem Sinne einer Zurückführung auf bekannte chemische Analogien. Ferner ist darauf hinzuweisen, daß es nicht bewiesen und nach chemischer Analogie unwahrscheinlich ist, daß die zuerst einsetzenden Vorgänge, die sich beim physiologischen Abbau der Fettsäuren abspielen, Oxydationsprozesse sind.

Um der Frage nach den Prozessen, die den Abbau der Fettsäuren im tierischen Organismus vermitteln, näher zu kommen, scheint die Lösung einer anderen Frage Vorbedingung zu sein. Diese Frage lautet: Welche chemischen Bedingungen muß eine Fettsäure erfüllen, um im Tierkörper abgebaut werden zu können?

Ich habe versucht, zur Lösung dieser Frage beizutragen, indem ich das Verhalten substituierter Fettsäuren im tierischen Organismus prüfte, und habe damit begonnen, das Verhalten der normalen, racemischen Amidosäuren, sowie ihrer Methylierungsprodukte zu untersuchen.

---

[1]) l. c., S. 161.

Ich bediente mich folgender Methodik, um die Ausscheidung einer verfütterten Substanz zu verfolgen. Im 24 stündigen Hundeharn ist das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff, wie durch die Untersuchungen von Voit, Rubner, Crämer und anderer festgestellt worden ist, ein recht konstantes, eine Tatsache, auf die Spiro[1]) erst kürzlich wieder die Aufmerksamkeit gelenkt hat. Erscheint eine verfütterte Substanz ganz oder teilweise im Harn wieder, so verschiebt sich das Verhältnis C:N, und die Bestimmung des Quotienten C:N der Versuchstage im Vergleich zu dem Quotienten C:N der Vor- und Nachperiode liefert Anhaltspunkte zur Berechnung, wieviel von der verfütterten Substanz im Harn wieder ausgeschieden wird. Ich habe dieses Verfahren benutzt, um die Menge der verfütterten Substanzen zu bestimmen, die den Tierköper unverändert passieren, und diese Bestimmung wurde, soweit es möglich war, durch Isolierung der ausgeschiedenen Substanz kontrolliert.

Beide Methoden geben, wie alle Fütterungsversuche, bei denen nicht gleichzeitig der Gasstoffwechsel untersucht wird, direkten Aufschluß nur über die im Harn ausgeschiedene Substanzmenge; über das Schicksal desjenigen Anteils, der nicht zur Ausscheidung gelangt, geben sie keine Auskunft. Ich möchte daher vermeiden, von dem Nichtauftreten einer Substanz im Harn auf ihre „Verbrennung“ im Organismus zu schließen, und ziehe vor, anstatt von der Verbrennung einer Substanz im Organismus von ihrer Ausnutzung durch den Organismus zu sprechen.

In vorliegender Mitteilung seien meine Erfahrungen an den normalen α-Aminosäuren vom Glykokoll bis zur α-Amino-n-capronsäure aufwärts mitgeteilt. Das Resultat ist kurz gefaßt folgendes. Nach Verfütterung von Glykokoll, d-l-Alanin, d-l-Amino-n-buttersäure, d-l-Amino-n-valeriansäure in Dosen zu 5 g per os an einen 9,2 bzw. 8,4 kg schweren Hund war vollständige Ausnutzung dieser Substanzen zu konstatieren, während der Kohlenstoff der d-l-Amino-n-capronsäure nach Applikation von 5 g Substanz per os zu 13,52 Proz. im Harn ausgeschieden wurde. Bezüglich des Glykokolls und des d-l-Alanins bietet dieser Befund nur eine Bestätigung bekannter Tatsachen, während Beobachtungen über das Verhalten der d-l-Amino-n-buttersäure, d-l-Amino-n-valeriansäure und der d-l-Amino-n-capronsäure bisher nicht vorliegen.

---

[1]) Diese Beiträge 10, 277. Hier auch die Literatur.

Experimenteller Teil.

Die in den unten beschriebenen Versuchen mitgeteilten Kohlenstoffbestimmungen wurden nach Messinger[1]) in 5 ccm Harn ausgeführt mit der Modifikation, daß ich die Verbrennung im Sauerstoffstrom ausführte. Die entweichenden Gase wurden, nachdem sie mittels Schwefelsäure und Chlorcalcium getrocknet waren, durch ein 52 cm langes mäßig erhitztes Rohr geleitet, das eine 27 cm lange Schicht von grobem Kupferoxyd enthielt, dem sich zwei mit Bleisuperoxyd gefüllte Schiffchen anschlossen. Die mitgeteilten Zahlen sind das Mittel von gut übereinstimmenden Doppelbestimmungen.

Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt. Auch hier wurden stets Doppelanalysen ausgeführt.

Die Versuchshunde wurden mit 250 g Hundekuchen, der in 1000 ccm Wasser eingeweicht war, ernährt.

Der von selbst entleerte Harn wurde von 8 Uhr morgens des einen Tages bis 8 Uhr morgens des anderen Tages gesammelt und analysiert.

1. Glykokoll.

Das verfütterte Glykokoll war ein von Kahlbaum bezogenes reines Präparat. Der Versuchshund B wog 9,2 kg.

Datum Dez. 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
8.— 9.	497	3,929	3,117	0,793	5 g Glykokoll in 50 ccm Wasser per Schlundsonde. Mit 50 ccm Wasser nachgespült
9.—10.	1095	8,978	7,334	0,817	
10.—11.	962	6,673	4,817	0,721	
11.—12.	841	7,128	5,266	0,739	
12.—13.	738	5,791	4,613	0,797	

Die mitgeteilten Zahlen zeigen, daß das eingeführte Glykokoll vollständig ausgenutzt ist. Dementsprechend konnte in den vereinigten Harnen vom 10.—11. und 11.—12. mit Hilfe von β-Naphtalinsulfochlorid kein Glykokoll nachgewiesen werden.

2. d-l-Alanin.

Das verfütterte d-l-Alanin war ein von Kahlbaum bezogenes Präparat. Der Versuchshund B wog 9,2 kg.

[1]) Berl. Ber. **21**, 2910; **23**, 2756.

Datum Dez. 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
2.— 3.	815	6,074	5,037	0,827	
3.— 4.	975	6,503	4,866	0,748	
4.— 5.	620	3,649	2,776	0,761	5 g d-l-Alanin in 50 ccm Wasser per Schlundsonde. Mit 50 ccm Wasser nachgespült
5.— 6.	1020	6,382	4,718	0,739	
6.— 7.	1109	6,861	5,468	0,797	5 g d-l-Alanin in 50 ccm Wasser. Mit 50 ccm Wasser nachgespült
7.— 8.	815	5,145	4,188	0,814	
8.— 9.	497	3,929	3,117	0,793	
9.—10.	1095	8,979	7,334	0,817	

Bei der ersten Fütterung am 4. Dezember preßte der Hund einen Teil der eingegossenen Alaninlösung durch die Schlundsonde wieder heraus. Der Versuch wurde deshalb am 6. Dezember wiederholt.

Das eingeführte d-l-Alanin wird restlos ausgenutzt. Beim Behandeln mit β-Naphtalinsulfochlorid gibt der Harn der Versuchstage kein Naphtalinsulfoalanin.

3. d-l-α-Amino-n-buttersäure.

Der Versuch wurde wieder am Hund B (9,2 kg) ausgeführt. Die verfütterte Aminobuttersäure war von Kahlbaum bezogen.

Datum Dez. 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
12.—13.	738	5,791	4,613	0,797	
13.—14.	928	6,223	4,818	0,792	
14.—15.	1150	8,100	6,800	0,839	5 g d-l-α-Amino-n-buttersäure in 50 ccm Wasser per Schlundsonde. Mit 50 ccm Wasser nachgespült
15.—16.	1040	6,965	5,900	0,847	
16.—17.	832	6,477	5,714	0,882	
17.—18.	998	7,704	5,906	0,767	

Die eingeführte d-l-α-Amino-n-buttersäure wird vollständig ausgenutzt. Auch mittels β-Naphtalinsulfochlorid ist im Harn des Versuchstages keine Aminosäure nachzuweisen.

4. d-l-α-Amino-n-valeriansäure.

d-l-α-Amino-n-valeriansäure stellte ich mir durch Einwirkung von Ammoniak auf α-Brom-n-valeriansäure [1]) dar. Von der Reinheit des Präparates überzeugte ich mich durch eine Stickstoffbestimmung.

[1]) Bull. soc. chim. 37, 4.

0,2014 g Substanz gaben 20,93 ccm N (15,8°, 752,9 mm).

	Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$	Gefunden
N	11,99 Proz.	12,03 Proz.

Der Versuchshund A wog 8,4 kg.

Datum Dez. 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
11.—12.	746	6,505	4,745	0,713	
12.—13.	840	5,699	4,211	0,738	
13—14.	685	8,529	6,306	0,739	5 g d-l-α-Amino-n-valeriansäure in 50 ccm Wasser per Schlundsonde. Mit 50 ccm Wasser nachgespült
14.—15.	880	7,415	5,722	0,754	
15.—16.	798	6,431	4,836	0,752	
16.—17.	588	5,889	4,734	0,804	

Die untersuchte d-l-α-Amino-n-valeriansäure wird restlos ausgenutzt. Im Harn des Versuchstages ist keine Aminosäure mittels β-Naphtalinsulfochlorids nachzuweisen.

5. d-l-α-Amino-n-capronsäure.

d-l-α-Amino-n-capronsäure wurde durch Einwirkung von Ammoniak auf α-Brom-n-capronsäure dargestellt [1]). Zur Kontrolle der Reinheit wurde eine Stickstoffbestimmung ausgeführt.

0,1922 g Substanz gaben 17,81 ccm N (14,8°, 755 mm).

	Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$	Gefunden
N	10,71 Proz.	10,79 Proz.

Der Versuch wurde an Hund A ausgeführt. Die verfütterte Substanz wurde in 38 ccm Normalnatronlauge gelöst, die Lösung mit 12 ccm Wasser verdünnt und per Schlundsonde dem Tiere beigebracht. Darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Jan. 1907	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
5.— 6.	735	6,584	4,859	0,738	
6.— 7.	740	5,918	4,133	0,698	
7.— 8.	874	6,892	5,053	0,733	
8.— 9.	1065	6,008	5,182	0,863	5 g d-l-α-Amino-n-capronsäure
9.—10.	891	7,526	5,239	0,696	
10.—11.	882	6,742	5,096	0,774	
11.—12.	746	6,505	4,745	0,713	

[1]) Journ. f. prakt. Chem. [2] 1, 6.

Der Quotient C:N im Mittel der drei Vortage und der drei Nachtage beträgt 0,725, der Quotient C:N des Versuchstages 0,863, zeigt also eine deutliche Verschiebung zugunsten des Kohlenstoffs. Die Gesamtstickstoffausscheidung des Versuchstages beträgt 6,008 g N, eine Menge, der, unter Zugrundelegung des normalen Quotienten C:N = 0,725, eine Kohlenstoffausscheidung von 4,355 g C entsprechen würde. Tatsächlich gefunden sind 5,182 g. Die Differenz des gefundenen und des berechneten Kohlenstoffwertes

Gefunden	5,182 g C
Berechnet	4,355 g C
Differenz	0,827 g C

ergibt die Mehrausscheidung an Kohlenstoff für den Versuchstag. Diese Mehrausscheidung setzt sich aus zwei Summanden zusammen: der eine wird bedingt durch den Übergang des eingeführten Natriumhydroxyds in Natriumbikarbonat [1]), der andere durch die Ausscheidung des Anteils der Aminocapronsäure, der nicht völlig ausgenutzt ist. Da 38 ccm n-NaOH eingeführt wurden, die 1,52 g NaOH und 0,874 g Na entsprechen, so berechnet sich die maximale Menge von Kohlenstoff, der zur Bindung des Natriumhydroxyds verwendet wird, zu 0,456 g C. Die Subtraktion dieser Zahl von dem Werte, der für die Mehrausscheidung an Kohlenstoff für den Versuchstag ermittelt ist, ergibt die Menge des unausgenutzten Kohlenstoffs.

Mehrausscheidung	0,827 g C
Als $NaHCO_3$ gebundener C	0,456 g C
Unausgenutzter C	0,371 g C

Da 5 g der eingeführten Substanz 2,745 g Kohlenstoff entsprechen, so sind 13,52 Proz. des Kohlenstoffs der Aminocapronsäure ausgeschieden worden. Unter der Annahme, daß diese Menge auf unveränderte Aminocapronsäure zu beziehen ist, wären 0,676 g α-Amino-n-capronsäure zur Ausscheidung gekommen.

Zur Isolierung der Substanz wurde der Harn vom 8.—9. mit Bleiacetat geklärt und das Filtrat in bekannter Weise mit 6,8 g β-Naphtalinsulfochlorid behandelt. Beim Ansäuern der Reaktionsflüssigkeit wurde ein öliges Naphtalinsulfoderivat erhalten, das ein schwer lösliches Kalksalz lieferte, dessen Menge aber zur Reindarstellung nicht ausreichte.

---

[1]) Bei Ausscheidung des eingeführten Natriumsalzes in anderer Bindung würde sich eine höhere Ausscheidung der eingeführten Substanz berechnen.

X.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

Zweite Mitteilung.

Das Verhalten der normalen methylierten d-l-α-Aminosäuren im Organismus des Hundes.

Von **E. Friedmann.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Die ersten Versuche, am Stickstoff substituierte Aminosäuren zum Studium der im Tierkörper sich abspielenden Prozesse heranzuziehen, stammen von Schultzen[1]). Schultzen verfütterte Sarkosin an Hunde und erhielt dabei Resultate, die von Salkowski[2]) und von Baumann und v. Mering[3]) dahin berichtigt wurden, daß Sarkosin beim Menschen und bei Hunden zum größten Teile unverändert ausgeschieden wird. In jüngerer Zeit hat Magnus-Levy[4]) benzoylierte Aminosäuren Kaninchen subcutan beigebracht, um die Möglichkeit einer Bildung von Glykokoll aus höheren Aminosäuren zu prüfen. Magnus-Levy verfütterte Benzoyl-d-l-alanin, Benzoyl-d-l-aminobuttersäure, Benzoyl-l- und d-l-leucin, Benzoyl-l-asparaginsäure und Benzoyl-l-glutaminsäure und stellte fest, daß die genannten Benzoylverbindungen mit Ausnahme des Benzoylleucins annähernd quantitativ wieder ausgeschieden werden, während das Benzoylleucin in Hippursäure übergeht.

Die Versuche von Magnus-Levy scheinen darauf hinzudeuten, daß die Abbaufähigkeit der Aminosäuren durch Substitution eines Wasserstoffatoms der Aminogruppe durch einen Acylrest aufgehoben

---

[1]) Berl. Ber. 5, 578.
[2]) Ebenda 7, 116.
[3]) Ebenda 8, 584.
[4]) Münch. med. Wochenschr. 1905, S. 2168.

wird, daß also allgemein die Gruppe R.CH(NH Acyl).COOH nicht abbaufähig ist. Die zu dieser Deutung in Widerspruch stehende Tatsache, daß Benzoylleucin in Hippursäure übergeht, legt die Vermutung nahe, daß die Abbaumöglichkeit des Benzoylleucins bedingt wird durch den chemischen Bau der Gruppe R der allgemeinen Formel R.CH(NH.Acyl).COOH. Nun liegt dem Leucin ein Kohlenstoffskelett mit verzweigter Kohlenstoffkette zugrunde, während die beiden von Magnus-Levy verfütterten benzoylierten Aminosäuren, die zum Leucin chemische Vergleichspunkte bieten, das Benzoylalanin und die Benzoylaminobuttersäure eine normale Kohlenstoffkette haben.

Es erhebt sich daher die Frage: Besteht ein prinzipieller Unterschied beim Abbau normaler und verzweigter Karbonsäuren im Tierkörper?

Zur Beantwortung dieser Frage habe ich das Verhalten der normalen und der verzweigten methylierten Aminosäuren im Organismus des Hundes untersucht und berichte in der vorliegenden Arbeit zunächst über die Resultate, die ich über das Verhalten der normalen methylierten α-Aminosäuren gewonnen habe.

Die verfütterten Substanzen wurden in Dosen zu 5 g in 100 ccm Wasser gelöst und per Schlundsonde appliziert. Geprüft wurde das Verhalten der ersten fünf Glieder der Reihe des Sarkosins, also des Sarkosins, der d-l-α-Methylaminopropionsäure, der d-l-α-Methylamino-n-buttersäure, der d-l-α-Methylamino-n-valeriansäure und der d-l-α-Methylamino-n-capronsäure.

Die nachstehende Tabelle gibt die Zusammenstellung der erhaltenen Resultate.

Eingeführt			Ausgeschieden		
Substanz	Menge g	entspr. C g	C-Vermehrung g	C-Vermehrung entspr. Substanz g	C-Vermehrung in Prozenten der verfütterten Substanz Proz.
$CH_2(NH.CH_3).COOH$	5	2,020	0,701	1,735	34,70
$CH_3.CH(NH.CH_3).COOH$	5	2,305	0,770	1,670	33,41
$CH_3.CH_2.CH(NH.CH_3).COOH$	5	2,539	0,761	1,499	29,97
$CH_3.CH_2.CH_2.CH(NH.CH_3).COOH$	5	2,745	2,738	4,873	97,47
$CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CH(NH.CH_3).COOH$	5	2,895	2,241	3,870	77,40

Die Tabelle zeigt, daß die niedrigen Glieder der Reihe, das Sarkosin, das d-l-α-Methylalanin und die d-l-α-Methylaminobuttersäure zu ungefähr einem Drittel unverändert wieder ausgeschieden werden, während die höheren Glieder, die d-l-α-Methylaminovaleriansäure und die d-l-α-Methylaminocapronsäure zum größten Teil unangegriffen den Organismus verlassen. Da ich in der vorangehenden Arbeit[1]) zahlenmäßig den Nachweis habe erbringen können, daß die nicht methylierten normalen α-Aminosäuren von C_2 bis C_5 vollständig ausgenutzt werden und nur die normale α-Aminocapronsäure zu 13,52 Proz. den Organismus passiert, so ergibt der Vergleich dieser Reihe mit der Reihe der entsprechenden monomethylierten Aminosäuren, daß der Ersatz eines Wasserstoffatoms der NH_2-Gruppe durch die CH_3-Gruppe für die Glieder C_2, C_3, C_4 eine erhebliche Erschwerung und für die Glieder C_5 und C_6 nahezu eine Aufhebung des Abbaues bedeutet.

Diese Feststellung ist auch nach einer anderen Richtung von Interesse. Sie zeigt, daß die von Knoop[2]) für die phenylsubstituierten Fettsäuren ausgesprochene Hypothese eines Oxydationsangriffes in β-Stellung zur Carboxylgruppe im Tierkörper für die normalen methylierten α-Aminosäuren nicht nachweisbar ist.

Experimenteller Teil.

1. Sarkosin.

Das untersuchte Sarkosin war ein von Kahlbaum bezogenes Präparat. Um eine Wiedergewinnung des Sarkosins aus dem Harn, die bisher nicht geglückt war, zu ermöglichen, suchte ich das Sarkosin durch Darstellung des Phenylcyanats und des β-Naphtalinsulfoderivats zu charakterisieren.

Phenylcyanat des Sarkosins. 1,8 g Sarkosin werden in 20 ccm $^1/_{10}$n-Natronlauge gelöst und unter starker Kühlung allmählich mit 2,4 g Phenylcyanat versetzt. Nach beendeter Reaktion wird mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und die kristallinische Ausscheidung aus heißem Alkohol umkristallisiert. Es scheidet sich zunächst Diphenylharnstoff (0,1 g) aus, darauf beim Stehen im Eisschrank 2 g des gesuchten Phenylcyanats. Aus der 15-fachen

---

[1]) Diese Beiträge 11, 151.
[2]) Ebenda 6, 150.

Menge heißen Wassers umkristallisiert, bildet die Substanz lange Nadeln mit beiderseitig abgestumpften Enden. F. 106°.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1352 g Substanz gaben 0,3138 g CO_2 und 0,0689 g H_2O.
0,2084 g „ „ 27,58 ccm N (20,9°, 748 mm).

	Berechnet für $C_{10}H_{10}N_2O_2$	Gefunden
C	63,09 Proz.	63,30 Proz.
H	5,30 „	5,70 „
N	14,77 „	14,90 „

Die Analysen zeigen, daß das Anhydrid der Methylphenylhydantoinsäure[1]) vorliegt. Auch bei der Darstellung von anderen Phenylcyanaten N-methylierter α-Aminosäuren habe ich stets die Anhydride erhalten. Bemerkenswert ist, daß diese Anhydride durchgängig in Äther löslich sind.

β-Naphtalinsulfosarkosin. 1,8 g Sarkosin werden in 20 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge gelöst und mit einer ätherischen Lösung von 9 g β-Naphtalinsulfochlorid vier Stunden geschüttelt. Nach je einer Stunde werden je 20 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge hinzugefügt. Beim Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure werden 7,6 g eines kristallinischen Produktes erhalten, das aus einer siedenden Mischung von 140 ccm Wasser und 40 ccm Alkohol umkristallisiert wird. Die Ausbeute beträgt 4,9 g Substanz vom Schmelzpunkt 172 bis 173°. Die Substanz kristallisiert aus wässerigem Alkohol in platten Nadeln und einseitigen Plättchen und gibt in verdünntem Ammoniak gelöst mit Baryumchlorid und Calciumchlorid langsam entstehende kristallinische Fällungen.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,1410 g Substanz gaben 0,2933 g CO_2 und 0,0672 g H_2O.
0,2100 g „ „ 9,60 ccm N (22,9°, 755 mm).

	Berechnet für $C_{13}H_{13}NSO_4$	Gefunden
C	55,87 Proz.	56,73 Proz.
H	4,70 „	5,33 „
N	5,02 „	5,15 „

Das verfütterte Sarkosin wurde zu 5 g in 50 ccm Wasser geöst und Hund A (8,4 kg) mittels Schlundsonde beigebracht, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

[1]) Unter etwas anderen Bedingungen ist von Paal und Ganser (Berl. Ber. 28, 3227) aus Phenylcyanat und Sarkosin die entsprechende Ureïdosäure halten worden.

Datum Dez. 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
8.— 9.	834	7,637	5,859	0,767	
9.—10.	835	5,342	3,702	0,693	
10.—11.	860	6,501	5,390	0,829	5 g Sarkosin
11.—12.	305	2,722	2,040	0,749	
12.—13.	278	3,764	2,795	0,743	

Der Quotient C:N des Versuchstages beträgt 0,829, das Mittel der Quotienten C:N der Vor- und Nachtage 0,738. Es hat also eine Vermehrung des im Harn ausgeschiedenen Kohlenstoffs stattgefunden, die 1,735 g unverändert ausgeschiedener Substanz entspricht. Das eingeführte Sarkosin wird demnach zu 34,7 Proz. wieder ausgeschieden.

Auch das Bild, das die Verteilung des Stickstoffs im Harn nach Verfütterung von Sarkosin zeigt, ergibt deutlich, daß Sarkosin zum Teil unverändert ausgeschieden wird. Jedoch sind die normalen Schwankungen der im 24stündigen Harn ausgeschiedenen Monaminosäurenmengen zu große, um eine Berechnung der ausgeschiedenen Sarkosinmenge zu gestatten.

Die einzelnen Fraktionen der ausgeschiedenen stickstoffhaltigen Substanzen wurden nach Pfaundler[1]) in der von Stolte[2]) beschriebenen Weise bestimmt. Der Übersichtlichkeit halber gebe ich nur die Zahlen der Gesamtstickstoffausscheidung und die der Monaminosäurenfraktion wieder.

Datum Juni 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Aminosäuren-N g	Aminosäuren-N Gesamt-N Proz.	Bemerkungen
25.—26.	538	5,146	0,323	5,92	
26.—27.	1336	6,456	0,034	0,62	
27.—28.	875	4,922	0,550	11,18	5 g Sarkosin Hund A
28.—29.	1084	7,346	0,480	6,27	
29.—30.	1180	5,946	0,586	9,87	

Zur Isolierung des im Harn wieder ausgeschiedenen Sarkosins wurde der Harn des Versuchstages mit Bleiacetat ausgefällt, das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff gefällt. Das Filtrat

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 75.
[2]) Diese Beiträge 5, 15.

wurde vom Schwefelwasserstoff durch Einleiten von Luft befreit, mit Natronlauge genau neutralisiert, darauf mit 42 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge und einer ätherischen Lösung von 19 g β-Naphtalinsulfochlorid sechs Stunden geschüttelt, unter dreimaligem Hinzufügen von je 42 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge nach je einer Stunde. Beim Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure wurde eine milchige Trübung erhalten, die rasch einer kristallinischen Ausscheidung Platz machte. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank wurde das Reaktionsprodukt abgesaugt, in 100 ccm Wasser suspendiert und durch tropfenweisen Zusatz von verdünntem Ammoniak zur Lösung gebracht. Nach 12stündigem Stehen wurde das ungelöste β-Naphtalinsulfamid abfiltriert und das Filtrat mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Der jetzt ausfallende Niederschlag hatte bereits den Schmelzpunkt des β-Naphtalinsulfosarkosins. Seine Menge betrug 5,2 g, entsprechend 34,56 Proz. der eingeführten Menge Sarkosin. Da das Präparat noch etwas braun gefärbt war, wurde es in der 20fachen Menge heißen Wassers unter tropfenweisem Hinzufügen von Alkohol gelöst, die Lösung mit Tierkohle entfärbt und das in der Kälte ausfallende Produkt noch einmal aus wässerigem Alkohol umkristallisiert.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,1490 g Substanz gaben 0,3086 g CO_2 und 0,0674 g H_2O.
0,2127 g „ „ 9,99 ccm N (18,9°, 751 mm).

	Berechnet für $C_{13}H_{13}NSO_4$	Gefunden
C	55,87 Proz.	56,49 Proz.
H	4,70 „	5,06 „
N	5,03 „	5,35 „

Die Analyse zeigt, daß die Substanz β-Naphtalinsulfosarkosin ist. Dem entspricht, daß ein Gemisch gleicher Teile von synthetischem β-Naphtalinsulfosarkosin und dem aus dem Harn isolierten β-Naphtalinsulfoderivat scharf bei 172 bis 173° schmolz.

Die Menge des aus dem Harn isolierten β-Naphtalinsulfosarkosins beträgt 34,56 Proz. des eingeführten Sarkosins und zeigt gute Übereinstimmung mit der aus der Änderung des Quotienten C:N berechneten Menge von 34,7 Proz.

2. d-l-α-Methylaminopropionsäure.

Darstellung. α-Methylaminopropionsäure ist von Lindenberg[1]) durch Einwirkung von gesättigtem wässerigen Methylamin

[1]) Journ. f. prakt. Chem. [2] 12, 244.

auf α-Chlorpropionsäureester bei 120 bis 130° dargestellt worden. Ich habe es vorgezogen, diese Substanz aus α-Brompropionsäure und 33 prozentiger wässeriger Methylaminlösung in der Kälte zu bereiten.

50 g α-Brompropionsäure werden in 100 ccm 33 prozentiger wässeriger Methylaminlösung unter guter Kühlung eingeträufelt und die Reaktionsflüssigkeit drei Wochen bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Darauf wird durch Kochen mit 800 ccm kalt gesättigter Barytlösung unverändertes Methylamin verjagt, der Baryt mit Schwefelsäure genau entfernt, der gebildete Bromwasserstoff durch Eintragen von frisch gefälltem Silberoxyd beseitigt und das in Lösung gegangene Silber als Schwefelsilber gefällt. Nach Verjagen des Schwefelwasserstoffs durch Einleiten von Luft wird die erhaltene Flüssigkeit eingedampft und die beim Einengen gewonnene Kristallisation durch Zusatz von Alkohol und Äther vervollständigt. Es wurden 27,4 g Rohprodukt erhalten, die aus 250 ccm 95 prozentigem siedenden Alkohol unter Zusatz von einigen Tropfen Wasser umkristallisiert wurden und 20 g analysenreine Substanz lieferten.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,1940 g Substanz gaben 22,29 ccm N (21,2°, 758 mm).

	Berechnet für $C_4H_9NO_2$	Gefunden
N	13,01 Proz.	13,57 Proz.

Phenylcyanat der d-l-α-Methylaminopropionsäure. 2 g α-Methylaminopropionsäure werden in 20 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge gelöst und unter starker Kühlung allmählich mit 2,5 g Phenylcyanat versetzt. Nach dem Verdünnen mit Wasser wird von einem bei der Reaktion entstandenen Niederschlag abgesaugt und das Filtrat mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Das sich ausscheidende Produkt besteht aus dünnen Plättchen, die häufig kammartige Anordnung zeigen. Nach einmaligem Umkristallisieren aus 20 ccm 95 prozentigem Alkohol werden 3,1 g einer Substanz erhalten, die in schmalen, langen, vierseitigen Plättchen kristallisiert und bei 145 bis 146° schmilzt.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,1519 g Substanz gaben 0,3636 g CO_2 und 0,0847 g H_2O.
0,1998 g „ „ 24,02 ccm N (21,5°, 760 mm).

	Berechnet für $C_{11}H_{12}N_2O_2$	Gefunden
C	64,65 Proz.	65,28 Proz.
H	5,92 „	6,24 „
N	13,75 „	13,76 „

Die Analyse zeigt, daß das Anhydrid des Phenylcyanats der α-Methylaminopropionsäure vorliegt. Dem entspricht, daß die Substanz unlöslich in Soda und löslich in Äther ist. Mit Natronlauge erwärmt geht die Substanz in Lösung, um beim Erkalten das schwer lösliche Natronsalz abzuscheiden.

Verhalten im Tierkörper. Die Bestimmung des Quotienten C:N nach Fütterung von d-l-α-Methylaminopropionsäure wurde an Hund A (8,4 kg) ausgeführt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Nov. 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
25.—26.	1002	4,542	3,645	0,803	
26.—27.	825	3,684	2,988	0,811	
27.—28.	1036	4,736	4,644	0,981	5 g d-l-α-Methylaminopropionsäure
28.—29.	1037	5,230	4,208	0,805	
29.—30.	897	4,370	4,728	0,853	

Der Quotient C:N im Mittel der Vor- und Nachtage beträgt 0,818, der Quotient C:N des Versuchstages 0,981. Die Vermehrung des im Harn ausgeschiedenen Kohlenstoffs entspricht 1,670 g Substanz oder 33,41 Proz. der eingeführten d-l-α-Methylaminopropionsäure.

Die Stickstoffverteilung nach Fütterung von d-l-α-Methylaminopropionsäure wurde an Hund B (9,2 kg) verfolgt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Juni 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Aminosäuren-N g	Aminosäuren-N Gesamt-N Proz.	Bemerkungen
25.—26.	545	7,488	0,384	5,13	
26.—27.	948	6,951	0,233	3,34	
27.—28.	830	5,887	0,581	9,88	5 g d-l-α-Methylaminopropionsäure
28.—29.	972	6,974	0,220	3,14	
29.—30.	815	7,793	0,306	3,95	

Die Tabelle zeigt ebenfalls, daß d-l-α-Methylaminopropionsäure den Körper zum Teil unverändert passiert.

Zur Isolierung der α-Methylaminopropionsäure diente der Harn vom 27.—28. Nov. 1906. Derselbe wurde eingedampft, mit 100 ccm Wasser aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde mit 100 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge alkalisch gemacht und mit 10 g Phenylcyanat allmählich unter energischem Kühlen versetzt.

Nachdem das Phenylcyanat verbraucht ist, wird die Flüssigkeit mit Salzsäure genau neutralisiert und die trübe Lösung auf dem Wasserbade eine Viertelstunde erwärmt. Dabei klärt sich die Flüssigkeit und setzt außer reichlichen Mengen von Diphenylharnstoff klebrige, braune Massen ab. Die Ausscheidungen werden durch Filtration in der Wärme beseitigt und das Filtrat zur Kristallisation aufgestellt. Schon die warme Flüssigkeit setzt reichlich Kristalle ab, die sich bei 12 stündigem Stehen in der Kälte vermehren. Ihre Menge beträgt 3,3 g. Sie sind das Natriumsalz des gesuchten Phenylcyanats. Zur Überführung in das Phenylcyanat werden sie in 200 ccm heißen Wassers unter Zusatz von wenig verdünnter Salzsäure gelöst. Aus der erkalteten Lösung scheiden sich prächtige, noch etwas braun gefärbte Kristalle aus, die aus 30 ccm 95 prozentigem Alkohol unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisiert werden. Es wurden 2,5 g Phenylcyanat erhalten.

Die Substanz schmilzt bei 145 bis 146°. Denselben Schmelzpunkt zeigt ein Gemisch gleicher Teile dieser Substanz mit dem oben beschriebenen Phenylcyanat der d-l-α-Methylaminopropionsäure. Sie ist also mit dieser identisch.

Die Substanz ist in 10 prozentiger alkoholischer Lösung optisch inaktiv.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1399 g Substanz gaben 0,3341 g CO_2 und 0,0787 g H_2O.
0,2044 g „ „ 24,83 ccm N (24°, 760 mm).

	Berechnet für $C_{11}H_{12}N_2O_2$	Gefunden
C	64,65 Proz.	65,12 Proz.
H	5,92 „	6,29 „
N	13,75 „	13,70 „

Die Menge der aus dem Harn isolierten d-l-α-Methylaminopropionsäure entspricht 1,26 g oder 5,25 Proz. der eingeführten Substanz, während sich die im Harn vorhandene Menge aus der Änderung des Quotienten C:N zu 33,41 Proz. berechnet.

3. d-l-α-Methylamino-n-buttersäure.

Darstellung der d-l-α-Methylamino-n-buttersäure. α-Methylamino-n-buttersäure ist von Duvillier[1]) durch Einwirkung wässeriger Methylaminlösung auf α-Brombuttersäure im geschlossenen Gefäß in der Wärme dargestellt worden. Ich habe ebenfalls gute Ausbeuten an Methylaminobuttersäure erhalten, indem ich 50 g α-Brombuttersäure mit 85 ccm 33 prozentiger Methylaminlösung bei Zimmertemperatur 14 Tage stehen ließ und die Reaktionsflüssigkeit nach Duvillier aufarbeitete. Ausbeute 25,7 g.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,1976 g Substanz gaben 21,39 ccm N (21,9°, 751 mm).

	Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$	Gefunden
N	11,99 Proz.	12,18 Proz.

Phenylcyanat der d-l-α-Methylamino-n-buttersäure. 2,7 g d-l-α-Methylamino-n-buttersäure werden in 20 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge gelöst und mit 2,4 g Phenylcyanat unter starker Kühlung allmählich versetzt. Beim Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure fällt die Substanz als öliger, rasch erstarrender Niederschlag aus. Seine Menge beträgt 4,1 g. Zur Reinigung wird sie aus viel heißem Wasser umkristallisiert, aus dem sie in schönen Nadeln sich abscheidet. Ausbeute 2,8 g. F. 104°.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1258 g Substanz gaben 0,3082 g CO_2 und 0,0777 g H_2O.
0,1805 g „ „ 21,23 ccm N (22,2°, 756,5 mm).

	Berechnet für $C_{12}H_{14}N_2O_2$	Gefunden
C	66,01 Proz.	66,81 Proz.
H	6,46 „	6,91 „
N	12,87 „	13,32 „

Die Substanz ist unlöslich in Soda, löst sich in warmer Natronlauge und ist leicht löslich in Äther.

Verhalten im Tierkörper. Die Bestimmung des Quotienten C:N nach Fütterung von α-Methylamino-n-buttersäure wurde an Hund B (9,2 kg) ausgeführt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und mittels Schlundsonde dem Versuchstier eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

---

[1]) Ann. de Chim. [5] 20, 188.

Datum Nov. 1906	Volumen des 24stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
25.—26.	950	5,546	4,581	0,826	
26.—27.	867	4,755	3,982	0,837	5 g d-l-α-Methyl-amino-n-butter-säure
27.—28.	857	5,126	4,861	0,953	
28.—29.	885	6,574	5,083	0,773	
29.—30.	738	5,583	4,282	0,767	

Der Quotient C:N im Mittel der Vor- und Nachtage beträgt 0,800. Der Quotient C:N des Versuchstages 0,953. Die Vermehrung des im Harn ausgeschiedenen Kohlenstoffs entspricht 1,499 g Substanz oder 29,97 Proz. der eingeführten α-Methylamino-n-buttersäure.

Die Stickstoffverteilung nach Fütterung von d-l-α-Methylamino-n-buttersäure wurde am Hund B (9,2 kg) verfolgt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und mittels Schlundsonde dem Versuchstier eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum	Volumen des 24stündigen Harns	Gesamt-N	Aminosäuren-N		Bemerkungen
				Gesamt-N	
Juli 1906	ccm	g	g	Proz.	
1.—2.	458	5,317	0,036	2,38	
2.—3.	584	4,163	0,411	9,88	5 g d-l-α-Methyl-amino-n-butter-säure
3.—4.	1000	5,559	0,933	16,77	
4.—5.	650	5,987	0,549	9,21	
5.—6.	650	6,460	0,465	7,19	

Die Änderung in der Ausscheidung der Aminosäurenfraktion spricht ebenfalls dafür, daß ein Teil der eingeführten α-Methyl-amino-n-buttersäure im Harn wieder zur Ausscheidung gelangt.

Zur Isolierung der α-Methylamino-n-buttersäure diente der Harn vom 27.—28. Nov. 1906. Derselbe wurde eingedampft, der Sirup mit 100 ccm Wasser aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde mit 100 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge alkalisch gemacht und mit 10 g Phenylcyanat allmählich unter starker Kühlung versetzt. Nachdem das Phenylcyanat verbraucht war, wurde die Reaktionsflüssigkeit neutralisiert und eine Viertelstunde auf dem Wasserbade erwärmt. Der ausgeschiedene Diphenylharnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat stark eingeengt, darauf mit verdünnter Salzsäure

angesäuert und mit Äther wiederholt ausgeschüttelt. Die ätherischen Auszüge wurden mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet und hinterließen nach Abdestillieren des Äthers 4,5 g eines öligen Rückstandes. Derselbe wurde in 10 prozentiger Natronlauge in der Wärme gelöst, und die alkalische Lösung im Vakuum über Schwefelsäure konzentriert. Dabei scheidet sich das Natriumsalz der gesuchten Verbindung in schön ausgebildeten Nadeln ab. Diese wurden auf Ton abgepreßt und in Wasser unter Zusatz von wenig Salzsäure in der Wärme gelöst. Aus der erkaltenden Lösung fällt das Phenylcyanat als rasch kristallinisch erstarrendes Öl nieder. Es wurde aus verdünntem Alkohol umkristallisiert und lieferte 2,2 g analysenreine Substanz vom Schmelzpunkt 104°.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1472 g Substanz gaben 0,3596 g CO_2 und 0,0894 g H_2O.
0,1821 g „ „ 20,89 ccm N (22,3°, 759,5 mm).

	Berechnet für $C_{12}H_{14}N_4O_2$	Gefunden
C	66,01 Proz.	66,62 Proz.
H	6,46 „	6,79 „
N	12,87 „	13,11 „

Die Analyse ergibt, daß die erhaltene Substanz das Anhydrid des Phenylcyanats der α-Methylamino-n-buttersäure ist. Dem entspricht, daß eine Mischung gleicher Teile dieses Produktes und des oben beschriebenen Phenylcyanats der α-Methylamino-n-buttersäure keine Erniedrigung des Schmelzpunktes erkennen läßt.

Das erhaltene Phenylcyanat ist in 10 prozentiger alkoholischer Lösung optisch inaktiv.

Die Menge der aus dem Harn isolierten d-l-α-Methylamino-n-buttersäure entspricht 1,18 g oder 26,61 Proz. der eingeführten Substanz, während sich die im Harn vorhandene Menge aus der Änderung des Quotienten C : N zu 29,97 Proz. berechnet.

4. d-l-α-Methylamino-n-valeriansäure.

Darstellung der d-l-α-Methylamino-n-valeriansäure. α-Methylamino-n-valeriansäure ist von Menozzi und Belloni[1]) durch Erwärmen äquivalenter Mengen Butyraldehyd und konzentrierter wässeriger Blausäurelösung, nachherigem Hinzufügen von 1 Mol. Methylamin und Verseifen des gebildeten Nitrils mit Salzsäure erhalten worden. Nach den Angaben dieser Forscher enthält

---

1) Gazz. chim. 17, 116.

diese methylierte Aminosäure 1 Mol. Kristallwasser und zersetzt sich von 110° an. Ich habe diese Angaben nicht bestätigen können.

Die Substanz wurde auf zwei verschiedenen Wegen dargestellt.

Erste Darstellung.

Brompropylmalonsäure. $CH_3 . CH_2 . CH_2 . CBr\begin{matrix} \diagup COOH \\ \diagdown COOH \end{matrix}$

11,2 g Propylmalonsäure[1]) werden in 55 ccm trockenem Äther gelöst und bei Sonnenlicht mit 5,2 ccm Brom tropfenweise versetzt. Das Brom wird zu Anfang rasch, später etwas langsamer verbraucht. Nach einstündigem Stehen wird die ätherische Lösung mit Wasser unter Zusatz von etwas schwefliger Säure versetzt und, nachdem Entfärbung eingetreten ist, zweimal mit wenig Wasser gewaschen. Die ätherische Lösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, der Äther abdestilliert und die letzten Ätherreste im Vakuum über Schwefelsäure entfernt. Dabei erstarrt das Produkt vollständig kristallinisch.

22 g Propylmalonsäure lieferten 38,2 g Brompropylmalonsäure.

α-Bromvaleriansäure. 38,2 g Brompropylmalonsäure wurden im Ölbade bei 145° erhitzt, bis keine Kohlensäureentwickelung mehr stattfand, und lieferten 27 g *α*-Bromvaleriansäure.

α-Methylamino-n-valeriansäure. 27 g *α*-Bromvaleriansäure wurden unter guter Kühlung mit $3^1/_2$ Mol. 33 prozentigem Methylamin übergossen und die Reaktionsflüssigkeit 14 Tage bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Darauf wurde das überschüssige Methylamin durch Kochen mit 1 Liter kalt gesättigtem Barytwasser vertrieben und die Flüssigkeit vom Baryum genau mit Schwefelsäure, vom Bromwasserstoff durch Silberoxyd und vom gelösten Silber durch Schwefelwasserstoff befreit. Nach Verjagen des Schwefelwasserstoffs durch Einleiten von Luft wurden durch Eindampfen 14,5 g Rohprodukt erhalten, das aus wässerigem Alkohol umkristallisiert wurde. Ausbeute 11 g analysenreine Substanz.

Zur Analyse wurde die Substanz durch Sublimation gereinigt und bei 100° getrocknet.

0,1300 g Substanz gaben 0,2609 g CO_2 und 0,1244 g H_2O.
0,2054 g „ „ 22 ccm N (22°, 760 mm).

	Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$	Gefunden
C	54,92 Proz.	54,72 Proz.
H	9,99 „	10,70 „
N	10,71 „	11,66 „

[1]) Monatsh. f. Chem. 9.

Zweite Darstellung.

Bei der zweiten Darstellung wurde von käuflicher n-Valeriansäure ausgegangen und diese nach den Angaben von Juslin[1]) in die α-Brom-n-valeriansäure übergeführt.

50 g α-Brom-n-valeriansäure wurden unter Kühlung in 75 ccm 33 prozentigem Methylamin eingetragen, die Reaktionsflüssigkeit zwei Monate bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen und darauf wie bei der ersten Darstellung aufgearbeitet.

Zur Reinigung wurde die Substanz aus Methylalkohol wiederholt umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 24,7 g.

Die analysierte Substanz war bei 100° getrocknet.

0,1946 g Substanz gaben 18,38 ccm N (19,2°, 755,9 mm).

	Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$	Gefunden
N	10,71 Proz.	10,84 Proz.

Die auf beiden Wegen erhaltene Methylaminovaleriansäure ist kristallwasserfrei und zeigt beim Erhitzen das Verhalten der übrigen homologen methylierten Aminosäuren: sie sublimiert unzersetzt etwa von 252° an, ohne vorher zu schmelzen. Sie unterscheidet sich aber von den niedrigen homologen Gliedern durch die Leichtigkeit, mit der sie in alkoholisch-wässeriger Lösung gallertige Lösungen bildet, die das Reinigen der Substanz erheblich erschweren.

Phenylcyanat der d-l-α-Methylamino-n-valeriansäure. 2 g α-Methylaminovaleriansäure (aus erster Darstellung) werden in 15,3 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge gelöst und unter starker Kühlung allmählich mit 1,8 Phenylcyanat versetzt. Beim Ansäuern mit starker Salzsäure fällt die Substanz als rasch erstarrendes Öl aus. Sie wird in 50 ccm heißen Wassers unter Hinzufügen von 15 ccm absol. Alkohol zur Lösung gebracht und die beim Erkalten auftretende Trübung durch tropfenweisen Zusatz von Alkohol gehoben. Die klare, erkaltete Lösung wird mit Wasser bis zur bleibenden Trübung versetzt, die nach wenigen Minuten eine prächtige Kristallisation von glitzernden, dünnen, regelmäßigen, sechsseitigen Plättchen absetzt. Die Ausbeute betrug 1,7 g. In derselben Weise noch einmal aus Alkohol-Wasser umkristallisiert, schmilzt das erhaltene Phenylcyanat bei 84 bis 85°.

Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz gab bei der Analyse folgende Werte:

[1]) Berl. Ber. 17, 2504.

0,1465 g Substanz gaben 0,3655 g CO_2 und 0,0927 g H_2O.
0,2062 g „ „ 20,97 ccm N (18,7°, 773 mm).

	Berechnet für $C_{13}H_{16}N_2O_2$	Gefunden
C	67,19 Proz.	67,04 Proz.
H	6,94 „	7,08 „
N	12,09 „	11,98 „

Die nach zweiter Darstellung erhaltene α-Methylaminovaleriansäure lieferte dasselbe Phenylcyanat vom Schmelzpunkt 84° bis 85°. Auch die Mischprobe der beiden Phenylcyanate ergab Identität.

Zur Analyse wurde das Phenylcyanat im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1884 g Substanz gaben 20,78 ccm N (17,1°, 752,2 mm).

	Berechnet für $C_{13}H_{16}N_2O_2$	Gefunden
N	12,09 Proz.	12,69 Proz.

Die Analysen zeigen, daß das erhaltene Produkt das Anhydrid des Phenylcyanats der α-Methylamino-n-valeriansäure ist. Es ist unlöslich in Soda, leicht löslich in Äther und gibt, mit 10 proz. Natronlauge erwärmt, ein in Natronlauge schwer lösliches Natriumsalz.

Naphtylcyanat der d-l-α-Methylamino-n-valeriansäure. 2 g α-Methylamino-n-valeriansäure werden in 15 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge gelöst und mit 2,5 g Naphtylcyanat unter gelindem Kühlen allmählich versetzt. Schon in alkalischer Lösung entsteht ein reichlicher Niederschlag, der das gesuchte Reaktionsprodukt mit wenig Dinaphtylharnstoff verunreinigt enthält. Es wird mit heißem Alkohol, der den Dinaphtylharnstoff ungelöst zurückläßt, ausgezogen und aus der alkoholischen Lösung mit Wasser gefällt. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol bildet das Produkt feine glitzernde Nadeln vom Schmelzpunkt 152 bis 153°.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1397 g Substanz gaben 0,3715 g CO_2 und 0,0861 g H_2O.
0,1983 g „ „ 175 ccm N (22,5°, 760 mm).

	Berechnet für $C_{17}H_{18}N_2O_2$	Gefunden
C	72,29 Proz.	72,52 Proz.
H	6,43 „	6,89 „
N	9,95 „	9,93 „

Verhalten im Tierkörper. Die Bestimmung des Quotienten C:N nach Fütterung von d-l-α-Methylamino-n-valeriansäure wurde an Hund A (8,4 kg) ausgeführt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und mittels Schlundsonde dem Versuchstier eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Nov. 1906	Volumen des 24stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
18.—19.	662	3,838	3,127	0,805	
19.—20.	843	4,907	3,941	0,803	5 g d-l-α-Methyl-amino-n-vale-riansäure
20.—21.	900	4,511	5,204	1,154	
21.—22.	357	3,338	3,504	1,051	
22.—23.	975	5,618	4,861	0,865	
23.—24.	816	3,068	2,461	0,802	
25.—26.	1002	4,542	3,645	0,803	
26.—27.	825	3,684	2,988	0,811	

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Ausscheidung der α-Methylamino-n-valeriansäure sich über drei Tage erstreckt. Der Quotient C : N im Mittel der Vor- und der Nachtage beträgt 0,804. Der Quotient C : N am ersten Tage der Ausscheidung beträgt 1,154 entsprechend 1,578 g C der Substanz, der Quotient C : N am zweiten Tage der Ausscheidung 1,051 entsprechend 0,824 g C der Substanz, der Quotient C : N am dritten Tage der Ausscheidung 0,865 entsprechend 0,336 g C der Substanz. Die Mehrausscheidung an Kohlenstoff an denjenigen Tagen, die unter dem Einfluß der eingeführten Methylaminovaleriansäure stehen, beträgt also 2,738 g C. Eingeführt mit der Substanz sind 2,745 g C, so daß also 4,873 g oder 97,47 Proz. der verfütterten α-Methylaminovaleriansäure mit dem Harn wieder ausgeschieden sind.

Die Stickstoffverteilung im Harn wurde gleichzeitig mit der Bestimmung des Quotienten C : N verfolgt.

Datum Nov. 1906	Volumen des 24stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Aminosäuren-N g	Aminosäuren-N Gesamt-N Proz.	Bemerkungen
18.—19.	662	3,838	0,123	3,20	
19.—20.	843	4,907	0,092	1,89	5 g d-l-α-Methyl-aminovalerian-säure
20.—21.	900	4,511	0,421	9,31	
21.—22.	357	3,338	0,278	8,34	
22.—23.	975	5,618	0,205	3,65	
23.—24.	816	3,068	0,098	3,19	

Auch diese Tabelle zeigt, daß die Ausscheidung der Methylaminovaleriansäure sich über mehrere Tage erstreckt. Deutlich ist der Ausschlag am 20.—21. und am 21.—22., während der dritte Tag eine sichere Vermehrung des Aminosäuren-N nicht erkennen läßt.

Die Isolierung der α-Methylamino-n-valeriansäure wurde auf folgendem Wege ausgeführt.

Die Harne vom 20.—23. wurden vereinigt und eingedampft. Der dicke Sirup wird mit 100 ccm Wasser aufgenommen, mit 100 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge versetzt und unter starker Kühlung mit 10 g Phenylcyanat allmählich versetzt. Nach beendeter Einwirkung wird mit Salzsäure genau neutralisiert, eine Viertelstunde auf dem Wasserbade erwärmt und filtriert. Das Filtrat wird auf etwa 75 ccm eingeengt und im Eisschrank zur Kristallisation aufgestellt. Die ausgeschiedenen Kristalle sind Phenylharnstoff. Sie werden abgesaugt und die Mutterlauge nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure ausgeäthert. Der ätherische Auszug wird eingedampft, der ölige Rückstand in Alkohol gelöst und mit Tierkohle entfärbt. Der nach dem Abdampfen des Alkohols zurückbleibende Sirup erstarrt nach sechs Monate langem Stehen im Vakuum über Schwefelsäure. Die erhaltenen Kristalle werden durch Abpressen auf Ton von der Mutterlauge befreit und aus wässerigem Alkohol wiederholt umkristallisiert.

Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 0,5 g. Ihr Schmelzpunkt lag bei 84 bis 85°. Denselben Schmelzpunkt zeigte ein Gemisch gleicher Teile dieser Substanz und des oben beschriebenen Phenylcyanats der α-Methylamino-n-valeriansäure.

Die Analyse des im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Körpers gab folgende Zahlen:

0,1573 g Substanz gaben 0,3879 g CO_2 und 0,0990 g H_2O.

	Berechnet für $C_{13}H_{16}N_2O_2$	Gefunden
C	67,19 Proz.	67,25 Proz.
H	6,94 „	7,04 „

5. d-l-α-Methylamino-n-capronsäure.

α-Methylamino-n-capronsäure ist von Duvillier[1]) aus α-Bromcapronsäure und Methylamin dargestellt. Bei der Darstellung der Substanz habe ich den von Duvillier angegebenen Weg eingehalten, nur habe ich auch hier gute Ausbeuten beim Einwirken von Methylamin in der Kälte auf α-Bromcapronsäure erhalten. Eine Stickstoffbestimmung überzeugte mich von der Reinheit der dargestellten Substanz.

---

[1]) Ann. de Chim. [5] 29, 166.

Zur Analyse wurde die Methylaminocapronsäure im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1981 g Substanz gaben 17,39 ccm N (21,2°, 754,8 mm).

	Berechnet für $C_7H_{15}NO_2$	Gefunden
N	9,68 Proz.	9,98 Proz.

Phenylcyanat der d-l-α-Methylamino-n-capronsäure. 2,9 g α-Methylamino-n-capronsäure werden in 20 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge gelöst und unter starker Kühlung mit 2,4 g Phenylcyanat allmählich versetzt. Der während des Schüttelns sich bildende Niederschlag wird durch Zusatz von Wasser zum größten Teil gelöst. Nach beendeter Einwirkung wird filtriert und das Filtrat mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Der zuerst ölige Niederschlag erstarrt nach längerem Stehen im Eisschrank kristallinisch. Seine Menge beträgt 3,9 g. Aus wässerigem Alkohol umkristallisiert, bildet die Substanz große Blättchen vom Schmelzpunkt 52 bis 53°.

Die Analyse des im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Körpers gab folgende Zahlen:

0,1401 g Substanz gaben 0,3511 g CO_2 und 0,1012 g H_2O.
0,2028 g „ „ 20,39 ccm N (14,7°, 741,1 mm).

	Berechnet für $C_{14}H_{18}N_2O_2$	Gefunden
C	68,24 Proz.	68,35 Proz.
H	7,37 „	8,08 „
N	11,42 „	11,65 „

Die Analyse zeigt, daß die Substanz das Anhydrid[1]) des Phenylcyanats der α-Methylamino-n-capronsäure ist.

Verhalten im Tierkörper. Die Bestimmung des Quotienten C:N nach Fütterung von α-Methylamino-n-capronsäure wurde an Hund A (8,4 kg) ausgeführt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und mittels Schlundsonde dem Versuchstier eingegossen; darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

---

[1]) Es dürfte von Interesse sein, auf den eigentümlichen Verlauf der Kurve der Schmelzpunkte, die die Phenylhydantoine in der homologen Reihe des Sarkosins zeigen, aufmerksam zu machen.

Anhydrid des Phenylcyanats des Sarkosins	106° F.
„ „ „ der α-Methylaminopropionsäure . .	145—146° „
„ „ „ „ α-Methylamino-n-buttersäure .	104° „
„ „ „ „ α-Methylamino-n-valeriansäure	84— 85° „
„ „ „ „ α-Methylamino-n-capronsäure .	52— 53° „

Datum Dez. 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
2.— 3.	292	3,276	2,384	0,728	
3.— 4.	932	5,570	4,049	0,727	5 g d-l-α-Methyl-amino-n-capron-säure
4.— 5.	412	3,269	2,955	0,904	
5.— 6.	1271	4,751	4,666	0,982	
6.— 7.	850	4,669	4,004	0,858	
7.— 8.	257	2,247	1,920	0,855	
8.— 9.	834	7,637	5,859	0,767	
9.—10.	835	5,342	4,309	0,807	

Die Tabelle zeigt, daß die Ausscheidung der α-Methylamino-n-capronsäure sich auf vier Tage erstreckt. Die Kohlenstoffvermehrung dieser Tage entspricht 3,870 g oder 77,40 Proz. der eingeführten Methylamino-n-capronsäure. Die Isolierung ist mir in diesem Falle nicht geglückt.

XI.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

Dritte Mitteilung.

Das Verhalten der verzweigten, methylierten d-l-α-Aminosäuren der Fettreihe im Organismus des Hundes.

Von **E. Friedmann.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Beobachtungen, daß Substanzen mit verzweigter Kohlenstoffkette bei biologischen Vorgängen eine andere Rolle spielen als Körper mit normaler Kohlenstoffkette, liegen in der Literatur vereinzelt vor. So hat Seifert[1]) gezeigt, daß Essigbakterien Alkohole mit normaler Kohlenstoffkette besser verarbeiten als die entsprechenden mit verzweigter Kette, Bokorny[2]) hat mit analogem Resultat Untersuchungen angestellt über den Nährwert von n-Buttersäure und n-Valeriansäure einerseits und Isobuttersäure und Isovaleriansäure andererseits, Magnus-Levy[3]) hat beobachtet, daß Benzoylaminoisobutylessigsäure bei subcutaner Injektion bei Kaninchen in Hippursäure übergeführt wird, während die Benzoylderivate von Aminosäuren mit normaler Kette unverändert den Organismus verlassen, und schließlich sei an die eingehenden Untersuchungen von Embden[4]) und seiner Mitarbeiter und die von Baer und Blum[5]) erinnert, die die Abhängigkeit der Bildung des Acetons und der β-Oxybuttersäure von der normalen bzw. von der verzweigten Struktur bestimmter Fettsäuren festgestellt haben. So

---

[1]) Zentralbl. f. Bakt., II. Abteilung, 3, 337.
[2]) Chem. Zentralbl. 1, 327 (1897).
[3]) Münch. med. Wochenschr. 1905, 2168.
[4]) Diese Beiträge 8, 129.
[5]) Arch. f. exp. Path. 55, 94.

bildet zum Beispiel nach den Untersuchungen von Baer und Blum n-Valeriansäure $CH_3 . CH_2 . CH_2 . CH_2 . COOH$ beim schweren Diabetes keine β-Oxybuttersäure, während die verzweigte Isovaleriansäure, $\frac{CH_3}{CH_3}{>}CH . CH_2 . COOH$, in β-Oxybuttersäure übergeht; so entsteht ferner bei der Durchblutung der Leber (Embden) aus dem gewöhnlichen Leucin, $\frac{CH_3}{CH_3}{>}CH . CH_2 . CH(NH_2) . COOH$, Acetessigsäure, während das normale Leucin, $CH_3 . CH_2 . CH_2 . CH_2 . CH(NH_2) . COOH$, keine Acetessigsäure liefert.

Diese Beobachtungen führen dazu, nach chemischen Analogien zu suchen, die die besondere Stellung der Substanzen mit verzweigter Kohlenstoffkette veranschaulichen. Erfahrungen nach dieser Richtung auf rein chemischem Gebiete liegen vor. R. Meyer [1]) hat gezeigt, daß allgemein Kohlenstoffverbindungen, die ein tertiäres Wasserstoffatom enthalten, durch Natronlauge und Kaliumpermanganat der direkten Hydroxylierung fähig sind, indem dieses tertiäre Wasserstoffatom durch die Hydroxylgruppe ersetzt wird. So geht z. B. Isobuttersäure in Oxyisobuttersäure, Cuminsäure in Oxypropylbenzoesäure über:

$$\frac{CH_3}{CH_3}{>}CH . COOH \longrightarrow \frac{CH_3}{CH_3}{>}C(OH) . COOH,$$

Isobuttersäure → Oxyisobuttersäure

$$COOH . C_6H_4 . CH{<}\frac{CH_3}{CH_3} \longrightarrow COOH . C_6H_4 . C(OH){<}\frac{CH_3}{CH_3}$$

Cuminsäure → Oxypropylbenzoesäure

Ferner geht nach den Beobachtungen von J. Bredt [2]) bei der Oxydation mit Salpetersäure Isovaleriansäure in Methyloxybernsteinsäure und Isocapronsäure in Methyloxyglutarsäure über:

$$\frac{CH_3}{CH_3}{>}CH . CH_2 . COOH \longrightarrow CH_3 . C(OH)(COOH) . CH_2 . COOH$$

Isovaleriansäure → Methyloxybernsteinsäure

$$\frac{CH_3}{CH_3}{>}CH . CH_2 . CH_2 . COOH \longrightarrow CH_3 . C(OH)(COOH) . CH_2 . CH_2 . COOH$$

Isocapronsäure → Methyloxyglutarsäure

---

[1]) Ann. 219, 234; 220, 59.
[2]) Berl. Ber. 14, 1780.

Die normalen Fettsäuren zeigen ein solches Verhalten nicht.

Es lag nahe, diese chemischen Erfahrungen auf physiologisches Gebiet zu übertragen und das Verhalten von Substanzen mit tertiärem Wasserstoff im Tierexperiment zu prüfen. Hierzu wählte ich die verzweigten methylierten Aminosäuren, da ich das Verhalten der normalen methylierten Aminosäuren, die die Grundlage eines Vergleiches bieten mußten, in einer früheren Arbeit[1]) festgestellt hatte.

Die nachstehende Tabelle zeigt die gewonnenen Resultate:

I.

Eingeführt			Ausgeschieden		
Substanz	Menge g	Entspr. C g	C-Vermehrung g	C-Vermehrung entspr. Substanz g	C-Vermehrung in Proz. der verfütterten Substanz Proz.
1. $\frac{CH_3}{CH_3}>C<\frac{NH.CH_3}{COOH}$	4	2,032	1,975	3,888	97,20
2. $\frac{CH_3}{CH_3}>CH.CH<\frac{NH.CH_3}{COOH}$	5	2,745	—	—	—
	5	2,745	—	—	—
	5	2,745	—	—	—
3. $\frac{CH_3}{C_2H_5}>CH.CH<\frac{NH.CH_3}{COOH}$.	5	2,895	0,271	0,468	9,36
4. $\frac{CH_3}{CH_3}>CH.CH_2.CH<\frac{NH.CH_3}{COOH}$	5	2,895	0,939	1,622	32,44

Zum Vergleich lasse ich die für die entsprechenden normalen methylierten Aminosäuren erhaltenen Zahlen folgen:

II.

Eingeführt			Ausgeschieden		
Substanz	Menge g	Entspr. C g	C-Vermehrung g	C-Vermehrung entspr. Substanz g	C-Vermehrung in Proz. der verfütterten Substanz Proz.
$CH_3.CH_2.CH<\frac{NH.CH_3}{COOH}$ . .	5	2,2539	0,761	1,499	29,97
$CH_3.CH_2.CH_2.CH<\frac{NH.CH_3}{COOH}$	5	2,745	2,738	4,873	97,47
$CH_3.CH_2.CH_2.CH_2$ $.CH<\frac{NH.CH_3}{COOH}$	5	2,895	2,241	3,870	77,40

[1]) Diese Beiträge 11, 158.

Den untersuchten Substanzen, die α-Methylaminoisobuttersäure ausgenommen, ist die Gruppe $R.CH<{NH.CH_3 \atop COOH}$ gemeinsam. Diese Gruppe enthält ein tertiäres Wasserstoffatom in α-Stellung zur Carboxylgruppe, während in der α-Methylaminoisobuttersäure dieses tertiäre Wasserstoffatom durch eine Methylgruppe ersetzt ist:

$$1.\quad {CH_3 \atop CH_3}>C<{NH.CH_3 \atop COOH}, \qquad R.\overset{}{\underset{*}{CH}}<{NH.CH_3 \atop COOH}$$

Der Einfluß, den der Ersatz dieses tertiären Wasserstoffatoms durch die Methylgruppe ausübt, ist unverkennbar. Während die α-Methylamino-n-buttersäure, $CH_3.CH_2.CH<{NH.CH_3 \atop COOH}$, nur zu 29,97 Proz. ausgeschieden sind, wird die entsprechende α-Methylaminoisobuttersäure, ${CH_3 \atop CH_3}>C<{NH.CH_3 \atop COOH}$, zu 97 Proz. wieder ausgeschieden. Der Ersatz des α-ständigen tertiären Wasserstoffs durch den Methylrest in der Gruppe $R.\underset{*}{CH}<{NH.CH_3 \atop COOH}$ hebt also in dem untersuchten Fall die Angreifbarkeit für den Organismus annähernd auf.

Die drei anderen geprüften verzweigten Säuren:

$$2.\quad {CH_3 \atop CH_3}>\underset{\beta}{\underset{*}{CH}}.\underset{\alpha}{\underset{*}{CH}}<{NH.CH_3 \atop COOH}$$

$$3.\quad {CH_3 \atop C_2H_5}>\underset{\beta}{\underset{*}{CH}}.\underset{\alpha}{\underset{*}{CH}}<{NH.CH_3 \atop COOH}$$

$$4.\quad {CH_3 \atop CH_3}>\underset{\gamma}{\underset{*}{CH}}.CH_2.\underset{\alpha}{\underset{*}{CH}}<{NH.CH_3 \atop COOH}$$

enthalten außer dem tertiären Wasserstoff in α-Stellung zur Carboxylgruppe noch ein zweites tertiäres Wasserstoffatom. Der Einfluß, den dieses zweite tertiäre Wasserstoffatom auf die Angreifbarkeit dieser Substanzen für den Organismus ausübt, ist recht deutlich. Während die normale α-Methylaminovaleriansäure zu 97 Proz. den Organismus unangegriffen verläßt, wird die verzweigte Methylaminovaleriansäure vollständig ausgenutzt, und während die normale α-Methylaminocapronsäure zu 77 Proz. wieder ausgeschieden wird, werden die beiden untersuchten verzweigten α-Methylaminocapronsäuren im Organismus erheblich besser verwertet; von der einen (Säure 3) erscheinen nur 9 Proz. im Harn wieder, von der anderen

(Säure 4) nur 32 Proz. Die Anwesenheit eines zweiten tertiären Wasserstoffatoms in den monomethylierten α-Aminosäuren erhöht also ihre Angreifbarkeit für den Organismus.

Noch eine weitere Schlußfolgerung erlauben die mitgeteilten Versuche. Die drei untersuchten verzweigten Säuren unterscheiden sich voneinander durch die Stellung des zweiten tertiären Wasserstoffatoms zur Carboxylgruppe. Während die α-Methylaminoisovaleriansäure (Säure 2) und die α-Methylamino-β-methylvaleriansäure (Säure 3) das zweite tertiäre Wasserstoffatom in β-Stellung zur Carboxylgruppe führen, steht in der α-Methylaminoisobutylessigsäure (Säure 4) das zweite tertiäre Wasserstoffatom in γ-Stellung zur Carboxylgruppe. Dementsprechend unterscheiden sich diese Substanzen in ihrem Verhalten im Tierkörper. Von den beiden Säuren mit tertiärem Wasserstoff in β-Stellung zur Carboxylgruppe wird die eine (Säure 2) vollständig, die andere (Säure 3) annähernd vollständig im Organismus ausgenutzt, während die Säure mit tertiärem Wasserstoff in γ-Stellung zur Carboxylgruppe zu einem Drittel unverändert ausgeschieden wird. Die Anwesenheit eines tertiären Wasserstoffatoms in β-Stellung zur Carboxylgruppe bildet für die monomethylierten α-Aminosäuren die größte Möglichkeit der Angreifbarkeit dieser Substanzen im Organismus.

Bei der Deutung, die diese Tatsachen fordern, wird die Aufmerksamkeit in erster Linie auf die Beobachtung von R. Meyer gelenkt, der erkannt hat, daß tertiärer Wasserstoff allgemein der Hydroxylierung fähig ist. Der Möglichkeit, die gefundenen Tatsachen im Sinne einer Oxydation zu erklären, steht aber scheinbar entgegen, daß für die Angreifbarkeit der methylierten Aminosäuren die Stellung des tertiären Wasserstoffatoms zur Carboxylgruppe maßgebend ist. Nun ist es aber einerseits eine auf chemischem Gebiet häufig zu machende Erfahrung, daß der Verlauf einer Reaktion durch für die Reaktion selber äußerlich bedeutungslose Veränderungen des Moleküls modifiziert wird [1]), und andererseits findet die feinere Abstufung, die eine allgemeine chemische Reaktion, wie in diesem Falle die oxydative Angreifbarkeit von tertiärem Wasserstoff, durch die Oxydationsmittel des Organismus erkennen

---

[1]) Hierher gehörige thermochemische Daten sind von Henderson (Journ. of Physic. Chem. 9, 40) zusammengestellt. Auf organisch-chemischem Gebiete finden sich einschlägige Beobachtungen bei Straus (Ann. d. Chem. 342, 190).

läßt, ihr chemisches Analogon in der nicht bloß physiologischen Spezifität der meisten Oxydationsmittel [1]). Vergegenwärtigt man sich ferner die Erfahrungen, die man bei den Oxydationswirkungen des Sorbosebakteriums gemacht hat, nach denen nur diejenigen polyvalenten Alkohole der Ketonoxydation befähigt sind, die die Konfiguration, $\overset{OH}{\underset{H}{—C}}\overset{OH}{\underset{H}{—C}}\overset{OH}{\underset{H}{—C—}}$, zeigen, so fällt die für die methylierten Aminosäuren ermittelte Tatsache der Abhängigkeit der Angreifbarkeit einer Atomgruppierung von ihrer relativen Lage zu anderen Gruppen im Molekül durchaus in den Rahmen der Beobachtungen, die über die Spezifität chemischer wie physiologischer Oxydationen bekannt sind.

Berücksichtigt man weiter, daß der tierische Organismus auf die Oxydation der ebenfalls ein tertiäres Wasserstoffatom in β-Stellung zur Carboxylgruppe führenden Isovaleriansäure, $\frac{CH_3}{CH_3}>CH.CH_2.COOH$, die nach den Untersuchungen von Embden [2]) als nächstes Abbauprodukt des Leucins, $\frac{CH_3}{CH_3}>CH.CH_2.CH(NH_2).COOH$, angesehen werden kann, eingerichtet sein muß, so ergibt sich, daß für die Abbaumöglichkeit der verzweigten methylierten Aminosäuren mit β-ständigem tertiären Wasserstoff in dem Verhalten der Isovaleriansäure das physiologische Paradigma gegeben ist. Die Möglichkeit ist daher zuzugeben, die gefundenen Tatsachen im Sinne einer Oxydation der das tertiäre Wasserstoff tragenden Gruppe vorläufig zu deuten, einer Oxydation, für die die β-Stellung des tertiären Wasserstoffs zur Carboxylgruppe die begünstigte Konfiguration bietet.

Diese Überlegungen haben eine gewisse äußere Ähnlichkeit mit der von Knoop entwickelten Hypothese eines Angriffspunktes der Oxydation in β-Stellung zur Carboxylgruppe. Sie unterscheiden sich aber von den von Knoop [3]) ausgesprochenen Vorstellungen

---

[1]) Um einige Beispiele unter vielen herauszugreifen, sei an die Verschiedenheit des Oxydationsangriffes in der Zuckerreihe erinnert, je nachdem als Oxydationsmittel Brom, Salpetersäure oder Wasserstoffsuperoxyd verwendet wird. Ebenso bekannt ist in der Terpenreihe die Abhängigkeit des Oxydationsproduktes vom angewendeten Oxydationsmittel.

[2]) Diese Beiträge 8, 129.

[3]) Ebenda 6, 150.

insofern wesentlich, als es sich in den erörterten Fällen allein um die oxydative Angreifbarkeit von tertiärem Wasserstoff handelt, also um eine allgemeine chemische Reaktion dieser Gruppierung, während nach der Knoopschen Regel Wasserstoff normaler Fettsäuren in β-Stellung zur Carboxylgruppe als Angriffspunkt der Oxydation angenommen wird, eine Annahme, auf deren Unwahrscheinlichkeit von chemischen Gesichtspunkten aus ich an anderer Stelle[1]) hingewiesen habe. Hierzu kommt weiter, daß die von Knoop beim Abbau der aromatischen, normalen Fettsäuren gefundene Regel schon deshalb auf die methylierten Aminosäuren keine allgemeine Anwendung finden kann, da gezeigt worden ist, daß bei den normalen methylierten Aminosäuren[2]) die Knoopsche Regel nicht nachweisbar ist. Das Verhalten der verzweigten methylierten Aminosäuren, das darauf hinweist, daß für diese Substanzen tertiärer Wasserstoff in β-Stellung zur Carboxylgruppe die günstigste Anordnung für ihre oxydative Angreifbarkeit im Tierkörper bedeutet, zeigt, daß der physiologische Abbau normaler und verzweigter Säuren verschiedenen Gesetzmäßigkeiten unterworfen ist. Während das Verhalten der Säuren mit verzweigter Kohlenstoffkette noch nicht genügend durchgearbeitet ist, um hier allgemein geltende Regeln aufzustellen, scheint dies für die normalen Fettsäuren möglich zu sein. Von den normalen Säuren der aromatischen Reihe hat Knoop beobachtet, daß die Säuren mit gerader Kohlenstoffseitenkette zu Phenylessigsäure, diejenigen mit ungerader Kohlenstoffseitenkette zu Benzoesäure abgebaut werden, und für die normalen Säuren der Fettreihe liegen Beobachtungen von Embden[3]) vor, nach denen die überlebende Leber aus n-Buttersäure und n-Capronsäure, nicht aber aus n-Valeriansäure Aceton bereitet. Die Knoopsche Vorstellung der β-Oxydation ist zur Deutung dieser Tatsachen entbehrlich, und ich möchte diese Beobachtungen unabhängig von jeder Hypothese zusammenfassen als Regel des paarigen Abbaus normaler Fettsäuren.

Eine andere Deutungsmöglichkeit könnte ihren Ausgang von der chemischen Beobachtung nehmen, daß normale und verzweigte Fettsäuren verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit besitzen[4]). Diese Deutung kann aber

---

[1]) Diese Beiträge **11**, 151.

[2]) Ebenda.

[3]) Ebenda **8**, 129.

[4]) Beobachtungen über die verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit normaler und verzweigter Säuren liegen vor für die Esterbildung (Menschutkin, zitiert nach Beilstein **1**, 389) und für die Amidbildung (H. Goldschmidt und R. Bräuer, Berl. Ber. **39**, 101).

für die gefundenen Tatsachen nicht in Betracht kommen, da die größere Reaktionsgeschwindigkeit den normalen Säuren zukommt, die größere Angreifbarkeit im Tierkörper aber den verzweigten, methylierten Aminosäuren. Ferner geht aus der Bildung von β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure beim physiologischen Abbau der Isovaleriansäure deutlich hervor, daß die ersten nachweisbaren Veränderungen der Isovaleriansäure im Tierkörper die Isopropylgruppe betreffen.

Experimenteller Teil.

1. d-l-α-Methylaminoisobuttersäure.



Darstellung der d-l-α-Methylaminoisobuttersäure.

50 g α-Bromisobuttersäure werden unter Kühlung in 85 ccm 33 proz. wässeriges Methylamin eingetragen und die Reaktionsflüssigkeit zwei Monate bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Darauf wird das unverbrauchte Methylamin durch Kochen mit kalt gesättigtem Barytwasser vertrieben. Die Lösung wird vom Baryt genau durch Schwefelsäure, vom Bromwasserstoff durch Silberoxyd, vom gelösten Silber durch Schwefelwasserstoff, vom Schwefelwasserstoff durch Einleiten von Luft befreit und zum Sirup eingedampft. Dieser setzt beim Stehen im Vakuum über Schwefelsäure spärliche Kristalle ab, die mit Alkohol verrührt und abgesaugt werden. Nach Umkristallisieren aus Alkohol werden 5 g analysenreines Produkt erhalten. Die Substanz kristallisiert in Nadeln und sublimiert beim Erhitzen bei annähernd 272° ohne vorher zu schmelzen.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1398 g Substanz gaben 0,2659 g CO_3 und 0,1216 g H_2O.
0,2059 g Substanz gaben 21,8 ccm N (23,5°, 746 mm).

	Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$	Gefunden
C	51,19 Proz.	51,87 Proz.
H	9,46 „	9,73 „
N	11,98 „	11,78 „

Das in üblicher Weise dargestellte Phenylcyanat der α-Methylaminoisobuttersäure kristallisiert in Plättchen und schmilzt bei 98 bis 99°. Es ist unlöslich in Soda, löst sich nur sehr unvollkommen in heißer Natronlauge und ist leicht löslich in Äther. Die Analyse der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz

ergab, daß die Substanz das Anhydrid des Phenylcyanats der α-Methylaminoisobuttersäure ist.

0,1481 g Substanz gaben 0,3593 g CO_2 und 0,860 g H_2O.
0,1800 g Substanz gaben 21,15 ccm N (22°, 757 mm).

	Berechnet für $C_{12}H_{14}N_2O_2$	Gefunden
C	66,01 Proz.	66,17 Proz.
H	6,46 „	6,50 „
N	12,87 „	13,25 „

Verhalten im Tierkörper.

Die Bestimmung des Quotienten C:N nach Fütterung von d-l-α-Methylaminoisobuttersäure wurde an Hund A (8,4 kg) ausgeführt. Es wurden 4 g Substanz in 40 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstiere mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum 1907	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C:N	Bemerkungen
23.—24. Jan.	880	6,665	5,040	0,736	
24.—25. „	491	5,449	3,966	0,724	
25.—26. „	880	6,791	4,939	0,727	
26.—27. „	768	5,189	3,779	0,728	
27.—28. „	675	5,899	4,135	0,701	
28.—29. „	832	5,995	5,890	0,983	4 g d-l-α-Methylaminoisobuttersäure
29.—30. „	861	6,274	5,161	0,823	
30.—31. „	460	3,458	2,632	0,761	
31.— 1. Fbr.	982	5,752	4,703	0,818	
1.— 2. „	615	4,294	3,385	0,788	

Die Tabelle zeigt, daß die Ausscheidung der α-Methylaminoisobuttersäure sich über zwei Tage erstreckt. Der Quotient C:N im Mittel der Vor- und Nachtage beträgt 0,748, der Quotient C:N der beiden Tage, die unter dem Einfluß der verfütterten Substanz stehen, 0,983 und 0,823. Die Mehrausscheidung von Kohlenstoff an diesen beiden Tagen entspricht 1,975 g C = 3,888 g Substanz oder 97,20 Proz. der eingeführten α-Methylaminoisobuttersäure.

Die Stickstoffverteilung im Harn nach Fütterung von α-Methylaminoisobuttersäure wurde an Hund A (8,4 kg) verfolgt. Zu diesem Zweck wurden 3 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Juli 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Aminosäuren-N g	Aminosäuren-N Gesamt-N Proz.	Bemerkungen
1.—2.	880	6,088	0,180	2,90	
2.—3.	742	4,733	0,483	10,32	3 g d-l-α-Methylaminoisobuttersäure
3.—4.	1125	5,178	0,878	16,96	
4.—5.	640	4,703	0,410	6,50	
5.—6.	1036	5,458	0,536	9,83	

Auch hier tritt die Vermehrung des Stickstoffs der Aminosäurenfraktion am Versuchstage deutlich hervor.

Zur Isolierung der α-Methylaminoisobuttersäure aus dem Harn wurde der Harn vom 3. bis 4. Juli 1906 eingedampft, der Rückstand in 100 ccm Wasser aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde mit 100 ccm $^1/_1$ n-Natronlauge versetzt und darauf unter starker Kühlung 10 g Phenylcyanat allmählich hinzugefügt. Nach beendeter Reaktion wurde mit Salzsäure genau neutralisiert, die neutrale Flüssigkeit eine Viertelstunde auf dem Wasserbade erwärmt und filtriert. Das Filtrat wurde auf ein kleines Volumen eingeengt, mit Salzsäure angesäuert und ausgeäthert. Der ätherische Auszug hinterließ nach Abdestillieren des Äthers 3 g eines öligen Rückstandes, der beim Stehen unter Wasser fest wurde. Er wurde in 50 ccm 50 proz. Alkohol in der Wärme gelöst. Die Lösung setzte beim Erkalten 0,12 g Diphenylharnstoff ab. Die wässerig-alkoholische Mutterlauge wurde eingedampft und der Rückstand in verdünnter Natronlauge gelöst; es bleibt eine geringe Menge einer öligen Substanz ungelöst, die von der alkalischen Flüssigkeit abgetrennt wurde und rasch erstarrte. Sie wurde aus verdünntem Alkohol umkristallisiert und lieferte 0,4 g analysenreines Produkt. Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 98 bis 99°, denselben Schmelzpunkt zeigte ein Gemisch gleicher Teile dieser Substanz und des oben beschriebenen Anhydrids des Phenylcyanats der α-Methylaminoisobuttersäure.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1382 g Substanz gaben 0,3357 g CO_2 und 0,767 g H_2O.
0,1770 g Substanz gaben 20,05 ccm N (23°, 756 mm).

	Berechnet für $C_{12}H_{14}N_2O_2$	Gefunden
C	66,01 Proz.	66,25 Proz.
H	6,46 „	6,21 „
N	12,87 „	12,77 „

2. d-l-α-Methylaminoisovaleriansäure.

$$\frac{CH_3}{CH_3}\!>\!CH.CH\!<\!\frac{NH.CH_3}{COOH}$$

Darstellung der α-Methylaminoisovaleriansäure.

α-Methylaminoisovaleriansäure ist von Duvillier[1]) durch Einwirkung von Methylamin auf α-Bromisovaleriansäure in der Wärme dargestellt worden. Ich erhielt ebenfalls gute Ausbeuten, als ich die beiden Substanzen bei Zimmertemperatur vier Wochen sich selbst überließ und die Reaktionsflüssigkeit nach Duvillier aufarbeitete.

Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0,2117 g Substanz gaben 19,97 ccm N (19,9°, 756,5 mm).

	Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$	Gefunden
N	10,71 Proz.	10,77 Proz.

Phenylcyanat der α-Methylaminoisovaleriansäure.

2 g Substanz werden in 15,3 ccm $^1/_1$ n-Natronlauge gelöst und unter starker Kühlung tropfenweise mit 1,8 g Phenylcyanat versetzt. Es findet eine geringe Ausscheidung von Diphenylharnstoff statt, die nach Verdünnen mit 10 ccm Wasser durch Filtration beseitigt wird. Das Filtrat gibt beim Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure 2,2 g des gesuchten Körpers. Er wird in 20 ccm Alkohol gelöst, und vorsichtig mit Wasser bis zur eben auftretenden Trübung versetzt und diese durch Zusatz eines Tropfen Alkohols wieder gehoben. Nach kurzer Zeit scheidet sich die Substanz in prächtigen langen Nadeln aus. Die Kristallisation wird jetzt durch Zusatz von Wasser vervollständigt.

Der Schmelzpunkt der Substanz liegt bei 75 bis 77°. Sie ist unlöslich in Soda, löslich in Äther. Die Analyse der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz ergab, daß das Anhydrid des Phenylcyanats der α-Methylaminoisovaleriansäure vorlag.

0,1503 g Substanz gaben 0,3703 g CO_2 und 0,0955 g H_2O.
0,1953 g Substanz gaben 20,97 ccm N (16,9°, 749,8 mm).

	Berechnet	Gefunden
C	67,19 Proz.	67,17 Proz.
H	6,94 „	7,12 „
N	12,32 „	12,09 „

[1]) Ann. de Chim. [5] 21, 434.

Verhalten im Tierkörper.

Die Bestimmung des Quotienten C:N wurde an Hund B (9,2 kg) ausgeführt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum 1906—1907	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C:N	Bemerkungen
17.—18. Dez.	998	7,704	5,906	0,767	5 g d-l-α-Methyl-aminoisovalerian-säure
18.—19. „	1037	7,254	5,572	0,768	
19.—20. „	791	7,051	4,923	0,698	
20.—21. „	820	7,078	5,068	0,716	
21.—22. „	897	7,975	5,671	0,711	
5.— 6. Jan.	800	6,852	4,983	0,727	
6.— 7. „	595	6,854	4,803	0,701	
7.— 8. „	1172	7,675	5,082	0,662	5 g d-l-α-Methyl-aminoisovalerian-säure
8.— 9. „	860	7,202	5,737	0,797	
9.—10. „	974	8,348	6,572	0,787	
10.—11. „	980	7,219	5,410	0,749	
11.—12. „	965	7,425	5,522	0,727	

Der Quotient C:N zeigt in beiden Reihen keine Änderung gegenüber der Norm. Die d-l-α-Methylaminoisovaleriansäure wird also vollständig ausgenutzt.

Die Verteilung des Stickstoffs nach Fütterung von d-l-α-Methylaminoisovaleriansäure wurde an Hund A (8,4 kg) verfolgt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Nov. 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Aminosäuren-N g	Aminosäuren-N Gesamt-N Proz.	Bemerkungen
7.— 8.	910	4,866	0,175	3,40	
8.— 9.	1025	4,577	0,326	7,13	5 g d-l-α-Methyl-aminoisovalerian-säure
9.—10.	895	3,933	0,250	6,36	
10.—11.	880	4,211	0,292	6,95	
11.—12.	1000	4,726	0,211	6,60	

Der Stickstoff der Aminosäurenfraktion ist am Versuchstage nicht vermehrt. Ob eine Retention von Stickstoff stattgefunden

hat, wie dies Abderhalden und Samuely[1]) für den Stickstoff des Leucins nachgewiesen haben, konnte nicht festgestellt werden, da der Harn der einzelnen Tage nicht durch Kathetrisieren abgegrenzt wurde.

3. d-l-α-Methylamino-β-methylvaleriansäure.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} > CH . CH < \begin{matrix} NH . CH_3 \\ COOH \end{matrix}$$

Als Ausgangsmaterial zur Darstellung der α-Methylamino-β-methylvaleriansäure benutzte ich die von Romburgh[2]) dargestellte sekundäre Butylmalonsäure.

Brombutylmalonsäure $\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} > CH . CBr < \begin{matrix} COOH \\ COOH \end{matrix}$

25,5 g sekundäre Butylmalonsäure werden in 130 ccm trockenem Äther gelöst und allmählich mit 10 ccm Brom versetzt. Nach einstündigem Stehen wird die ätherische Lösung mit wenig Wasser gewaschen, unverbrauchtes Brom mit schwefliger Säure entfernt, die Lösung noch zweimal mit wenig Wasser gewaschen, der Äther mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet und abdestilliert. Es hinterbleiben 46 g eines dicken Sirups.

Bromisobutylessigsäure $\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} > CH . CHBr \searrow COOH$

46 g Brombutylmalonsäure wurden im Ölbade auf 135 bis 145° (Temperatur des Bades) erwärmt, bis die Kohlensäureentwickelung aufgehört hat. Der ölige Rückstand wurde mit Äther aufgenommen, die ätherische Lösung mit wenig Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Äthers hinterblieben 31 g ölige, unreine Bromisobutylessigsäure.

α-Methylamino-β-methylvaleriansäure $\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} > CH . CH < \begin{matrix} NH . CH_3 \\ COOH \end{matrix}$

31 g der rohen Bromisobutylessigsäure wurden unter Kühlung mit 41 ccm 33 proz. wässerigem Methylamin versetzt, und die Reaktionsflüssigkeit 14 Tage bei 40° sich selbst überlassen. Dabei scheiden sich reichliche Kristallmengen aus. Die ausgeschiedene Kristallmasse wird mit Alkohol angerührt und abgesaugt. Ihre Menge betrug 10 g. Sie wurden aus 50 proz. Alkohol umkristalli-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 349.
[2]) Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas 6, 153.

siert. Die Substanz kristallisiert in farblosen, garbenförmig angeordneten Nadeln. Sie sublimiert bei 280° ohne vorher zu schmelzen.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,1353 g Substanz gaben 0,2878 CO_2 und 0,1316 g H_2O.
0,2112 g Substanz gaben 16,9 ccm N (21,2°, 770 mm).

	Berechnet für $C_7H_{15}NO_2$	Gefunden
C	57,91 Proz.	58,01 Proz.
H	10,43 „	10,86 „
N	9,68 „	9,46 „

Verhalten im Tierkörper.

Der Quotient C:N wurde an Hund B (9,2 kg) bestimmt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum 1907	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
23.–24. Jan.	888	7,123	5,147	0,723	
24.—25. „	756	6,498	4,820	0,742	
25.—26. „	945	7,874	6,093	0,888	
26.—27. „	713	6,316	5,040	0,798	
27.—28. „	910	8,285	6,542	0,790	
28.—29. „	841	7,418	6,161	0,830	5 g d-l-α-Methyl-amino-β-methyl-valeriansäure
29.—30. „	840	7,454	5,833	0,782	
30.—31. „	750	8,174	6,860	0,839	
1.— 2. Fbr.	780	6,852	5,270	0,769	

Der Quotient C:N des Versuchstages beträgt 0,830, der Quotient C:N der Vor- und Nachperiode im Mittel 0,794. Es sind also nur 0,468 g oder 9,36 Proz. der eingeführten α-Methylamino-β-methylvaleriansäure wieder ausgeschieden worden. Diese Zahl ist jedoch als Maximalzahl anzusehen, da der Harn an zwei Normaltagen während der Versuchsperiode einen höheren Quotienten C:N (0,888 und 0,839) aufwies als am Versuchstage (0,830).

4. d-l-α-Methylaminoisobutylessigsäure.

$$\frac{CH_3}{CH_3}{>}CH.CH_2.CH{<}\frac{NH.CH_3}{COOH}$$

Darstellung der d-l-α-Methylaminoisobutylessigsäure.

50 g α-Bromisocapronsäure werden unter Kühlung in 69 ccm 33 proz. wässeriges Methylamin eingetragen und bei Zimmer-

temperatur 8 Tage sich selbst überlassen. Bereits nach 16 Stunden ist die Flüssigkeit zu einem dicken Kristallbrei erstarrt. Die ausgeschiedenen Kristalle werden mit 100 ccm Alkohol angerührt, abgesaugt und mit 100 ccm Alkohol ausgewaschen. Ihre Menge beträgt 19 g. Sie bilden, aus wässerigem Alkohol umkristallisiert, platte Nadeln, die beim Erhitzen sublimieren, ohne vorher zu schmelzen.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,1769 g Substanz gaben 0,3805 g CO_2 und 0,1715 g H_2O.
0,1804 g Substanz gaben 15,35 ccm N (22,8°, 752 mm).

	Berechnet für $C_7H_{15}NO_2$	Gefunden
C	57,90 Proz.	58,66 Proz.
H	10,42 „	10,84 „
N	9,68 „	9,54 „

Phenylcyanat der d-l-α-Methylaminoisobutylessigsäure.

2,9 g Substanz werden in 20 ccm $^1/_1$ n-Natronlauge gelöst und mit 2,4 g Phenylcyanat allmählich unter starker Kühlung versetzt. Nach beendeter Reaktion wird mit Salzsäure angesäuert. Der halbfeste Niederschlag erstarrt erst nach 36stündigem Stehen im Eisschrank beim Reiben. Seine Menge beträgt 4,6 g. Zur Reinigung wird die Substanz in wässerigem Alkohol gelöst und in der Kälte mit Wasser bis zur eben auftretenden Trübung versetzt. Nach kurzer Zeit ist die Flüssigkeit von prächtigen, irisierenden, langgezogenen Plättchen durchsetzt. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 60 bis 61°. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus wässerigem Alkohol bleibt der Schmelzpunkt konstant.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1288 g Substanz gaben 0,3231 g CO_2 und 0,0879 g H_2O.
0,2132 g Substanz gaben 21,78 ccm N (20,3°, 753 mm).

	Berechnet für $C_{14}H_{18}N_2O_2$	Gefunden
C	68,24 Proz.	68,42 Proz.
H	7,37 „	7,63 „
N	11,41 „	11,62 „

Verhalten im Tierkörper.

Der Quotient C:N nach Fütterung von d-l-α-Methylaminoisobutylessigsäure wurde an Hund B (9,2 kg) bestimmt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen. Darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Nov. 1906	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
7.— 8.	1072	7,103	6,099	0,859	
8.— 9.	970	5,293	4,492	0,849	5 g d-l-α-Methyl-
9.—10.	968	6,040	5,892	0,975	aminoisobutyl-
10.—11.	990	5,937	4,741	0,799	essigsäure
11.—12.	770	5,563	4,331	0,779	

Aus den obigen Zahlen berechnet sich, daß 32,44 Proz. der eingeführten d-l-α-Methylaminoisobutylessigsäure im Harn wieder ausgeschieden werden.

Die Verteilung des Stickstoffs im Harn nach Fütterung von d-l-α-Methylaminoisobutylessigsäure wurde gleichzeitig mit der Bestimmung des Quotienten C:N am selben Hund B (9,2 kg) verfolgt.

Datum	Volumen des 24 stündigen Harns	Gesamt-N	Aminosäuren-N		Bemerkungen
Nov. 1906	ccm	g	g	Gesamt-N Proz.	
7.— 8.	1072	7,103	0,125	1,76	
8.— 9.	970	5,293	0,247	4,67	5 g d-l-α-Methyl-
9.—10.	968	6,040	0,513	8,50	aminoisobutyl-
10.—11.	990	5,937	0,308	7,26	essigsäure
11.—12.	770	5,563	0,180	3,57	

Auch diese Zahlen zeigen, daß ein Teil der eingeführten α-Methylaminoisobutylessigsäure sich der Zerstörung im Tierkörper entzieht.

Zur Isolierung der α-Methylaminoisobutylessigsäure aus dem Harn wurde der eingedampfte Harn des Versuchstages mit 100 ccm Wasser aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde mit 100 ccm $^1/_1$ n-Natronlauge und 10 g Phenylcyanat unter starker Kühlung versetzt. Nach beendeter Reaktion wurde mit Salzsäure genau neutralisiert und die Flüssigkeit eine Viertelstunde auf dem Wasserbade erwärmt. Darauf wurde filtriert, das Filtrat eingeengt, mit Salzsäure angesäuert und ausgeäthert. Die ätherischen Auszüge hinterließen nach Abdestillieren des Äthers einen sirupösen Rückstand, der außer Diphenylharnstoff und Phenylharnstoff das gesuchte Phenylcyanat enthielt. Diphenylharnstoff und Phenylharnstoff wurden durch fraktionierte Kristallisation aus wässerigem

Alkohol entfernt, und das Phenylcyanat durch Zusatz von Wasser abgeschieden. Nach Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol schmilzt die Substanz bei 60 bis 61° und erweist sich bei der Mischprobe als identisch mit dem Anhydrid des Phenylcyanats der α-Methylaminoisobutylessigsäure. Zur Analyse wird sie im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1273 g Substanz gaben 0,3195 g CO_2 und 0,0848 g H_2O.

	Berechnet für $C_{14}H_{18}N_2O_2$	Gefunden
C	68,24 Proz.	68,45 Proz.
H	7,37 „	7,45 „

In einem besonderen Versuche wurde auf die Anwesenheit von Sarkosin im Harn nach Fütterung von α-Methylaminoisobutylessigsäure geachtet und zu diesem Zweck der Harn mit Naphtalinsulfochlorid geschüttelt. Die Abwesenheit von Sarkosin konnte mit Sicherheit festgestellt werden. Diese Tatsache ist insofern von Wichtigkeit, als sie darauf hindeutet, daß der von Magnus-Levy beobachtete Übergang von Benzoylisobutylessigsäure in Hippursäure wohl kaum auf einen direkten Abbau des Benzoylleucins zu Hippursäure zu beziehen ist.

Anmerkung. Während des Druckes dieser Arbeit erschien eine Mitteilung von Magnus-Levy (Biochem. Zeitschr. 6, 541), aus der hervorgeht, daß die von Magnus-Levy als Benzoylleucin angesehene Substanz das Benzoylderivat einer „unbekannten Aminosäure“ war.

XII.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

Vierte Mitteilung.

Das Verhalten der normalen dimethylierten d-l-α-Aminosäuren im Tierkörper.

Von E. Friedmann.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

In einer früheren Mitteilung[1]) habe ich gezeigt, daß der Ersatz eines Wasserstoffatoms der Aminogruppe durch den Rest CH_3 für die normalen methylierten Aminosäuren eine erhebliche Erschwerung des Abbaues im Tierkörper zur Folge hat. Es lag daher die Frage nahe, wie sich der Abbau der Aminosäuren gestalten würde, wenn beide Wasserstoffatome der NH_2-Gruppe durch Methylreste substituiert wären.

Die folgende Tabelle gibt die gewonnenen Resultate wieder.

Eingeführt			Ausgeschieden		
Substanz	Menge g	entsprech. C g	C Vermehrung g	C Vermehrung entpr. Substanz g	C Vermehrung in Proz. der eingef. Substanz Proz.
1. $CH_2<^{N(CH_2)_2}_{COOH}$	5	2,382	1,114	2,338	46,77
2. $CH_3.CH<^{N(CH_3)_2}_{COOH}$	5	2,539	1,283	2,527	50,53
3. $CH_3.CH_2CH<^{N(CH_3)_2}_{COOH}$	5	2,745	1,256	2,880	57,60
4. $CH_3.CH_2.CH_2.CH<^{N(CH_3)_2}_{COOH}$	5	2,893	1,158	2,001	40,03
5. $CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CH<^{N(CH_3)_2}_{COOH}$	5	3,015	1,075	1,783	35,65

[1]) Diese Beiträge **11**, 158.

Die Tabelle zeigt, daß eine weitere Erschwerung des Abbaues der Aminosäuren durch Ersatz beider Wasserstoffatome der Aminogruppe durch Methylreste nicht stattfindet. Die untersuchten Substanzen werden zu durchschnittlich 50 Proz. wieder ausgeschieden.

Experimenteller Teil.

1. Dimethylaminoessigsäure.

Dimethylaminoessigsäure stellte ich mir aus Monochloressigsäure und wässerigem 33 proz. Dimethylamin dar. Zu ihrer Charakterisierung benutzte ich das schön kristallisierende Kupfersalz. Dieses wurde bei 100° getrocknet und analysiert.

0,1859 g Substanz gaben 17,39 ccm N (24,7°, 757 mm).

Berechnet für $C_8H_{16}N_2O_4Cu$	Gefunden
N . . . 10,45 Proz.	10,46 Proz.

Die Bestimmung des Quotienten C : N wurde an Hund A (8,4 kg) ausgeführt. Es wurden 5 g Dimethylaminoessigsäure in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Januar 1907	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
17.—18.	890	7,068	5,073	0,718	
18.—19.	820	5,706	5,175	0,907	
19.—20.	695	5,573	4,418	0,793	
20.—21.	452	5,849	4,029	0,689	
21.—22.	1153	7,376	6,698	0,908	5 g Dimethylaminoessigsäure
22.—23.	839	6,036	4,480	0,742	
23.—24.	880	6,665	5,040	0,736	
24.—25.	491	5,479	3,966	0,724	

Der Quotient C : N der Vor- und Nachtage beträgt im Mittel 0,757, der Quotient C : N des Versuchstages 0,908. Hieraus berechnet sich, daß 2,338 g oder 46,77 Proz. der eingeführten Dimethylaminoessigsäure sich der Zerstörung im Tierkörper entzogen haben.

2. d-l-α-Dimethylaminopropionsäure.

α-Dimethylaminopropionsäure ist von Duvillier[1]) aus α-Brompropionsäure und Dimethylamin dargestellt worden. Ich habe die

[1]) Bull. soc. chim. [3] 7, 99.

Substanz nach den Angaben von Duvillier bereitet und sie durch das von Duvillier dargestellte Kupfersalz charakterisiert. Zur Analyse wurde das Kupfersalz bei 110° getrocknet.

0,2419 g Substanz verloren bei 105° . . 0,0717 g H_2O.
0,1594 g „ gaben . . . . 0,0432 g CuO.
0,1637 g „ „ . . . . 13,79 ccm N (18,9°, 755,1 mm).

Berechnet für $C_{10}H_{20}N_2O_4Cu + 7\,H_2O$	Gefunden
H_2O . . 29,89 Proz.	29,64 Proz.
Berechnet für $C_{10}H_{20}N_2O_4Cu$	Gefunden
Cu . . . 21,50 Proz.	21,65 Proz.
N . . . 9,49 „	9,65 „

Der Quotient C:N nach Fütterung von α-Dimethylaminopropionsäure wurde an Hund B bestimmt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Januar 1907	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
17.—18.	785	7,623	5,849	0,750	
18.—19.	906	7,032	5,342	0,760	
19.—20.	811	7,235	5,791	0,800	
20.—21.	853	7,189	6,435	0,895	5 g d-l-α-Dimethylaminopropionsäure
21.—22.	1071	7,477	7,063	0,923	
22.—23.	898	6,932	5,119	0,738	
23.—24.	838	7,123	5,147	0,723	
24.—25.	756	6,498	4,820	0,742	

Der Quotient C:N der Vor- und Nachtage beträgt 0,773, der Quotient C:N nach Fütterung von d-l-α-Dimethylaminopropionsäure 0,923. Demnach sind 2,527 g oder 50,53 Proz. der eingeführten Substanz wieder ausgeschieden worden.

3. d-l-α-Dimethylamino-n-buttersäure.

Die Substanz wurde nach den Angaben von Duvillier[1]) dargestellt. Der Schmelzpunkt der reinen Substanz liegt bei 179°. Zu ihrer Charakterisierung wurde das Kupfersalz dargestellt und dieses aus Aceton umkristallisiert. Es kristallisiert aus Aceton kristallwasserfrei, während von Duvillier ein kristallwasserhaltiges Kupfersalz dargestellt worden ist.

[1]) Bull. soc. chim. [3] 35, 156.

Zur Analyse wurde das Kupfersalz bei 100° getrocknet.

0,1425 g Substanz gaben 0,0359 g CuO.
0,2063 g „ „ 15,37 ccm N (15,5°, 752,9 mm).

Berechnet für $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$		Gefunden
Cu . . .	20,13 Proz.	19,76 Proz.
N . . .	8,72 „	8,65 „

Die Bestimmung des Quotienten C:N wurde an Hund A (8,4 kg) ausgeführt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Dezember 1906	Volumen des 24stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C:N	Bemerkungen
12.—13.	278	3,764	2,795	0,743	
13.—14.	780	6,541	5,059	0,773	
14.—15.	844	5,236	6,063	1,158	5 g d-l-α-Dimethyl-aminobuttersäure
15.—16.	870	5,697	4,655	0,819	
16.—17.	890	5,911	4,607	0,779	
17.—18.	690	5,239	4,196	0,801	

Der Quotient C:N im Mittel der Vor- und Nachtage beträgt 0,774, der des Versuchstages 1,158 und der des ersten Nachtages 0,819. Hieraus berechnet sich, daß 2,280 g oder 57,6 Proz. der eingeführten d-l-α-Dimethylaminobuttersäure wieder zur Ausscheidung gelangt sind.

Zur Isolierung der α-Dimethylaminobuttersäure aus dem Harn wurde der Harn vom 14.—15. und 15.—16. vereinigt und mit 90 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt. In diese Flüssigkeit wurde eine Lösung von 100 g Kaliumnitrit in 500 ccm Wasser aus einem Tropftrichter, dessen Ablauf mit einer bis auf den Boden der Flüssigkeit reichenden Kapillare versehen war, eingeträufelt. Nach beendeter Reaktion werden die gelösten Stickoxyde durch Einleiten von Luft vertrieben, die Schwefelsäure mit Baryumkarbonat entfernt und das Filtrat vom Baryumsulfat eingedampft. Der Rückstand wurde mit Methylalkohol aufgenommen, filtriert, das Filtrat von neuem eingedampft, der Rückstand wieder in Methylalkohol gelöst und nochmals filtriert. Das Filtrat (350 ccm) wurde mit 25 ccm ätherischer Salzsäure (1 Tl. Äther, 1 Tl. konzentrierter Salzsäure) ausgefällt und eingedampft. Der sirupöse Rückstand wurde verestert, indem er in 100 ccm absolutem Methyl-

alkohol gelöst und in die Lösung gasförmige Salzsäure eingeleitet wurde. Darauf wurde der Methylalkohol im Vakuum abdestilliert und die Veresterung zweimal wiederholt. Der nach Abdestillieren des Methylalkohols hinterbleibende Sirup wurde mit 150 ccm Äther überschichtet, unter guter Kühlung mit 10 ccm Wasser und 6 ccm 33 proz. Natronlauge versetzt und mit Kaliumkarbonat zum dicken Brei verrührt. Darauf wurde die ätherische Schicht abgegossen und der Rückstand wiederholt mit 50 ccm Äther durchgeschüttelt, bis keine alkalisch reagierende Substanzen mehr vom Äther aufgenommen wurden. Nachdem die ätherischen Auszüge mittels Natriumsulfat getrocknet waren, wurde der Äther abdestilliert und der 1,8 g wiegende Rückstand durch sechsstündiges Kochen mit 100 ccm Wasser verseift. Dabei ging die Substanz bis auf Spuren in Lösung. Die Lösung wurde mit Tierkohle entfärbt und eingedampft, der Rückstand mit Alkohol aufgenommen, der Alkohol verjagt und der hinterbleibende Sirup im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es hinterblieben 1,2 g von Kristallen durchsetztem Sirup. Zur weiteren Reinigung wurde die Substanz in das Kupfersalz übergeführt und dieses durch fraktionierte Kristallisation aus Aceton-Petroläther gereinigt. Es wurden 0,3 g Kupfersalz in analysenreiner Form erhalten.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,1536 g Substanz gaben . . . . . 0,0383 g Cu O.

Berechnet für $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$	Gefunden
Cu . . . 20,13 Proz.	19,91 Proz.

4. d-l-α-Dimethylamino-n-valeriansäure.

Darstellung der d-l-α-Dimethylaminovaleriansäure.

41 g α-Brom-n-valeriansäure werden unter Kühlung in 80 ccm wässeriges, 33 proz. Dimethylamin eingetragen und bei 40° 20 Tage sich selbst überlassen. Nach dieser Zeit wird das unverbrauchte Dimethylamin durch Kochen mit 1200 ccm kalt gesättigtem Barytwasser verjagt, Baryum genau mit Schwefelsäure entfernt und die Flüssigkeit gründlich ausgeäthert. Nach Beseitigung des Bromwasserstoffs durch Silberoxyd, des gelösten Silbers durch Schwefelwasserstoff und des Schwefelwasserstoffs durch Einleiten von Luft wird die erhaltene Lösung eingedampft. Der hinterbleibende kristallinische Rückstand wird in Alkohol gelöst, die Lösung von wenigen schwärzlichen Flocken durch Filtration befreit und eingedampft. Der kristallinische Rückstand beträgt 15 g.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt aus der fünffachen Menge Alkohol durch Zusatz von Äther zweimal abgeschieden und zum Schluß aus heißem Essigäther umkristallisiert.

Die so gewonnene Substanz bildet farblose, hygroskopische, zarte Nädelchen vom Schmelzpunkt 182°. Sie ist leicht löslich in Wasser und Alkohol, schwer löslich in Essigäther, unlöslich in Äther und Petroläther.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1282 g Substanz gaben . . . 0,2726 g CO_2 und 0,1289 g H_2O.
0,1757 g „ „ . . . 14,79 ccm N (17,8°, 762,9 mm).

Berechnet für $C_7H_{15}NO_2$		Gefunden
C . . .	57,89 Proz.	57,99 Proz.
H . . .	10,42 „	11,25 „
N . . .	9,68 „	9,80 „

Das Kupfersalz kristallisiert in breiten Plättchen und enthält zwei Moleküle Kristallwasser. Es ist leicht löslich in Wasser und Alkohol. In Wasser gelöst und eingedampft, bildet es einen Sirup, der auf Zusatz einiger Tropfen Wasser erstarrt.

Bei der Analyse wurden folgende Zahlen erhalten.

0,2873 g Substanz verloren bei 110° 0,0259 g H_2O.
0,2873 g „ gaben . . . . . . 0,0600 g CuO.
0,1932 g „ „ . . . . . . 13,43 ccm N (20,8°, 759,7 mm).

Berechnet für $C_{14}H_{28}N_2O_4Cu + 2H_2O$		Gefunden
H_2O . . .	9,29 Proz.	9,01 Proz.
Cu . . .	16,40 „	16,69 „
N . . .	7,24 „	7,76 „

Verhalten im Tierkörper.

Die Bestimmung des Quotienten C:N nach Fütterung von d-l-α-Dimethylamino-n-valeriansäure wurde an Hund B (9,2 kg) ausgeführt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Die Tabelle zeigt, daß die Ausscheidung der α-Dimethylaminovaleriansäure sich über drei Tage erstreckt. Der Quotient C:N der Vor- und Nachtage beträgt im Mittel 0,804. Aus der Änderung dieses Quotienten an den drei Tagen, die unter dem Einfluß der verfütterten Substanz stehen, berechnet sich, daß 2,001 g oder 40,03 Proz. der eingeführten α-Dimethylamino-n-valeriansäure wieder zur Ausscheidung gelangt sind.

Datum Februar 1907	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
4.— 5.	620	8,000	6,442	0,805	
5.— 6.	802	7,682	6,346	0,809	
6.— 7.	750	8,494	6,869	0,809	5 g d-l-α-Dimethyl-aminovalerian-säure
7.— 8.	842	8,547	7,362	0,861	
8.— 9.	705	8,844	7,614	0,861	
9.—10.	630	7,462	6,165	0,826	
10.—11.	698	7,856	6,400	0,815	
11.—12.	840	9,211	7,537	0,818	
12.—13.	670	8,418	6,600	0,784	
13.—14.	730	8,437	6,654	0,789	

5. d-l-α-Dimethylamino-n-capronsäure.

40 g α-Brom-n-capronsäure werden unter Kühlung in 70 ccm 33 proz. wässeriges Dimethylamin eingetragen und bei 40° 21 Tage sich selbst überlassen. Die Reaktionsflüssigkeit wird in der bei der Darstellung der α-Dimethylamino-n-valeriansäure beschriebenen Weise aufgearbeitet und liefert 15 g Rohprodukt.

Zur Reinigung wurde die Substanz in das aus wässeriger Lösung gut kristallisierende Kupfersalz übergeführt, aus diesem durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff wiedergewonnen und zum Schluß aus der zwanzigfachen Menge Essigäther umkristallisiert. Die Substanz bildet feine verfilzte, sich fettig anfühlende Nadeln mit abgestumpften Enden, die bei 161 bis 162° schmelzen und bei höherem Erhitzen sublimieren. Sie ist unlöslich in Äther und Petroläther, schwer löslich in kaltem und ausreichend löslich in warmem Essigäther, unlöslich in kaltem Benzol, löst sich aber in Benzol in der Wärme, indem sie zuerst aufquillt und sich beim Erkalten gallertig ausscheidet, löslich in Aceton, und spielend löslich in Wasser, Alkohol und Chloroform.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure und Ätzkali getrocknet.

0,1459 g Substanz gaben . . . 0,3170 g CO_2 und 0,1437 g H_2O.
0,2054 g „ „ . . . 16,43 ccm N (17,1°, 757,9 mm).

Berechnet für $C_8H_{17}NO_2$		Gefunden
C . . .	58,92 Proz.	59,26 Proz.
H . . .	10,76 „	11,02 „
N . . .	8,82 „	9,28 „

Das Kupfersalz der α-Dimethylamino-n-capronsäure ist grau blau gefärbt. Es ist leichter löslich in Alkohol als in Wasser

und scheidet sich aus konzentrierter wässeriger Lösung häufig ölig ab. Wird seine alkoholische Lösung eingedampft, so hinterbleibt ein Sirup, der beim Verreiben mit Wasser fest wird. Bei 100° getrocknet, schmilzt es und wird tief violett. Es kristallisiert in Blättchen, die sternförmig angeordnet sind.

Zur Kupferbestimmung wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,4372 g Substanz verloren bei 100° . . . . . . 0,0201 g H_2O.
0,4171 g „ gaben . . . . 0,0872 g CuO.

Berechnet für $C_{16}H_{32}N_2O_4Cu + H_2O$	Gefunden
H_2O . . . . 4,53 Proz.	4,60 Proz.

Berechnet für $C_{16}H_{32}N_2O_4Cu$	Gefunden
Cu . . . . 16,78 Proz.	16,70 Proz.

Verhalten im Tierkörper.

Der Quotient C:N nach Fütterung von d-l-α-Dimethylamino-n-capronsäure wurde an Hund B (9,2 kg) bestimmt. Es wurden 5 g Substanz in 50 ccm Wasser gelöst und dem Versuchstier mittels Schlundsonde eingegossen, darauf wurde mit 50 ccm Wasser nachgespült.

Datum Februar 1907	Volumen des 24 stündigen Harns ccm	Gesamt-N g	Gesamt-C g	C : N	Bemerkungen
31.—1.	780	6,852	5,270	0,769	
1.—2.	920	9,203	7,252	0,789	
2.—3.	945	6,648	5,474	0,823	
3.—4.	1051	8,792	8,117	0,923	5 g d-l-α-Dimethyl-aminocapronsäure
4.—5.	620	8,000	6,442	0,805	
5.—6.	802	7,6[illegible]2	6,346	0,809	
6.—7.	750	8,494	6,869	0,809	

Der Quotient C:N im Mittel der Vor- und Nachtage beträgt 0,799, der Quotient C:N des Versuchstages 0,923. Hieraus berechnet sich, daß 1,783 g oder 35,65 Proz. der eingeführten α-Dimethyl-amino-n-capronsäure wieder ausgeschieden sind.

XIII.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

Fünfte Mitteilung.

Über eine Synthese der Acetessigsäure bei der Leberdurchblutung.

Von **E. Friedmann.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Untersuchungen beim schweren Diabetes haben ergeben, daß Buttersäure in β-Oxybuttersäure übergeht[1]). Ferner hat Embden[2]) gezeigt, daß die überlebende Leber aus Buttersäure Acetessigsäure und Aceton bereiten kann. Weiter ist von Knoop[3]) der Nachweis erbracht worden, daß Phenylbuttersäure im Organismus des Hundes zu Phenacetursäure abgebaut wird:

$$CH_3.CH_2.CH_2.COOH \begin{array}{l} \nearrow CH_3.CH(OH).CH_2.COOH \\ \rightarrow CH_3.CO.CH_2.COOH \\ \searrow CH_3.CO.CH_3 \end{array}$$

$$C_6H_5.CH_2.CH_2.CH_2.COOH \longrightarrow C_6H_5.CH_2.COOH.$$

Diese beiden Tatsachen sind von Knoop[4]) zusammenfassend gedeutet worden, indem er annimmt, daß Buttersäure durch β-Oxy-

---

[1]) Loeb, Zentralbl. f. Stoffwechsel- u. Verdauungskrankheiten 3, 98. Schwarz, Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 76, 233. Baer u. Blum, Arch. f. exp. Path. 55, 94.

[2]) Diese Beiträge 8, 129.

[3]) Ebenda 6, 150.

[4]) Der Abbau der aromatischen Fettsäuren im Tierkörper. Habilitationsschrift. Freiburg (Baden) 1904, S. 40.

dation in β-Oxybuttersäure, und ebenso Phenylbuttersäure durch β-Oxydation in Phenylessigsäure übergeführt wird.

Durch diese Deutung werden aber Tatsachen zusammengefaßt, die augenscheinlich recht wenig miteinander gemeinsam haben. Vom chemischen Standpunkte aus ist vielleicht zuzugeben, daß der Übergang von Phenylbuttersäure in Phenylessigsäure im weiteren Sinne als β-Oxydation aufgefaßt werden kann, wenn man dabei die Voraussetzung macht, daß die Bezeichnung β-Oxydation eine abgekürzte Ausdrucksweise für die Kette von Vorgängen bedeutet, die den paarigen Abbau der normalen Fettsänren ermöglichen. Dagegen steht die Deutung eines Überganges von Buttersäure in β-Oxybuttersäure als direkte Hydroxylierung eines in β-Stellung zur Carboxylgruppe stehenden Wasserstoffatoms einer normalen Fettsäure in Widerspruch zu dem chemischen Verhalten normaler Fettsäuren. Die Bildung von β-Oxybuttersäure aus Buttersäure kann sich daher nur auf Umwegen vollziehen.

Der von Knoop beobachtete Übergang von Phenylbuttersäure in Phenylessigsäure bildet vielleicht den Hinweis, nach welcher Richtung die für die Entstehung der β-Oxybuttersäure aus Buttersäure in Betracht kommenden Zwischenprodukte zu suchen sind. Ebenso wie die Phenylbuttersäure zu Phenylessigsäure abgebaut wird, könnte man sich vorstellen, daß die Buttersäure zu einer Substanz mit zwei Kohlenstoffatomen abgebaut, und aus dieser sekundär β-Oxybuttersäure synthetisch aufgebaut würde.

Der erste, der die Synthese von Fettsäuren aus niedrigen Homologen diskutiert hat, war Hoppe-Seyler[1]). Die Möglichkeit einer synthetischen Bildung der β-Oxybuttersäure, die auch von Knoop nicht ausgeschlossen wird, ist ebenfalls wiederholt erörtert worden, so von von Jaksch, Geelmuyden[2]) und besonders eingehend von Magnus-Levy[3]). Magnus-Levy[4]) erwähnt eine Hypothese von Spiro, nach der man sich die Bildung von β-Oxybuttersäure aus Milchsäure etwa in folgender Weise vorstellen könne. „Das Hydrat der Milchsäure zerfällt unter Wasseraufnahme in das Hydrat des Acetaldehyds und dasjenige der Ameisensäure (Erlenmeyersche Reaktion). Aus 2 Mol. Acetaldehyd könnte sehr leicht Buttersäure entstehen nach folgender Formel“:

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 2, 16.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 431; 26, 380.
[3]) Arch. f. exp. Path. 42, 225.
[4]) l. c., S. 226.

I.

$$CH_3.CH(OH).C\begin{matrix}/OH\\-OH\\ \backslash OH\end{matrix} + H_2O = CH_3.C\begin{matrix}/H\\-OH\\ \backslash OH\end{matrix} + H.C\begin{matrix}/OH\\-OH\\ \backslash OH\end{matrix}$$

Hydrat der Milchsäure — Hydrat des Acetaldehyds — Hydrat der Ameisensäure

II.

a

$$\begin{matrix}CH_3\\ |\\ CHO\\ \\ CH_3\\ |\\ CHO\end{matrix} \; - H_2O \; \begin{matrix}CH_3\\ |\\ CH\\ \|\\ CH\\ |\\ CHO\end{matrix}$$

b

$$\begin{matrix}CH_3\\ |\\ C\\ \|\\ CH\\ |\\ CHO\end{matrix} + \begin{matrix}H\\ H\end{matrix} + O \quad \begin{matrix}CH_3\\ |\\ CH_2\\ |\\ CH_2\\ |\\ COOH\end{matrix}$$

„Wenn dabei noch vor der fertigen Bildung der Buttersäure eine weitere Oxydierung statthat, so kommt man dabei nach Spiro ganz leicht zur Oxybuttersäure (oxydative Synthese)."

Auch Hugounenq[1]) hat einen ähnlichen Gedankengang entwickelt. „Er zeigt, daß man in vitro sehr leicht vom Traubenzucker über den Alkohol zu Aldehyd und von diesem über das Aldol und durch Oxydation zur Oxybuttersäure kommen könne. Indes lehnt er diesen Weg für die Ökonomie des tierischen Haushaltes ausdrücklich ab."

Zur Zeit, wo diese Hypothesen ausgesprochen wurden, waren unsere Kenntnisse über das Verhalten der Fettsäuren im Tierkörper noch zu lückenhaft, um eine experimentelle Stütze für eine der beiden obigen Vorstellungen abgeben zu können. Außerdem fehlte eine Methode, um die Möglichkeit einer Synthese der β-Oxybuttersäure experimentell zu prüfen. Eine hierfür brauchbare Methodik ist in jüngster Zeit von Embden[2]) mitgeteilt worden, der gezeigt hat, daß die überlebende Leber bei der Durchblutung normalerweise Aceton und Acetessigsäure bilden kann, und daß die Bildung dieser Substanzen nach Zusatz bestimmter Körper zum Durchblutungsblut erheblich erhöht wird. Ich bediente mich dieser Methode und prüfte, ob in der überlebenden Hundeleber aus Substanzen mit zwei Kohlenstoffatomen bei der Durchblutung Acetessigsäure entsteht.

---

[1]) Zitiert nach Magnus-Levy, l. c., S. 227, Anm. 1.
[2]) Diese Beiträge 8, 129.

In einer ersten Versuchsreihe wurde das Verhalten des Äthylalkohols, der Essigsäure und des Äthylenglykols geprüft. Die nachstehende Tabelle zeigt die gewonnenen Resultate.

Tabelle I.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durchblutungszeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
1	2 ccm Äthylalkohol 100 „ Ringersche Lösung 1500 „ Rinderblut	270	66	21,35
2	2 ccm Äthylalkohol 100 „ Ringersche Lösung 1500 „ Rinderblut	460	51	15,9
3	2 g Essigsäure mit NH_3 neutralisiert 100 ccm Ringersche Lösung 1500 „ Rinderblut	255	94	29,82
4	2 g Natriumacetat 100 ccm Ringersche Lösung 1500 „ Rinderblut	365	50	19,50
5	2 g Äthylenglykol 100 ccm Ringersche Lösung 1500 „ Rinderblut	390	59	5,69

Die Versuche zeigen, daß weder Äthylalkohol, noch Essigsäure, noch Äthylenglykol in Aceton übergehen können.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Verhalten des Acetaldehyds bei der Durchblutung geprüft. Der verwendete Aldehyd war unmittelbar vor der Durchblutung durch Destillation von Paraldehyd, das verwendete Aldehydammoniak aus unmittelbar vor der Durchblutung aus Paraldehyd destilliertem Aldehyd durch Einleiten von trockenem Ammoniak gewonnen worden (Tabelle II).

Als Kontrollversuch wurde mit dem Blute, das zu Versuch 9 gedient hatte, am selben Tage ein Durchblutungsversuch ohne Zusatz von Aldehyd ausgeführt und in gleicher Weise mit dem Blut von Versuch 10 verfahren. Versuch 11 ist die Kontrolle zu Versuch 9, Versuch 12 die zu Versuch 10 (Tabelle III).

Die in Tabelle II mitgeteilten Zahlen zeigen, daß Aldehydammoniak bei der Durchblutung der überlebenden Leber in Aceton

und Acetessigsäure übergeht. Bei der Durchblutung mit freiem Aldehyd ist die neugebildete Menge des Gesamtacetons nicht erheblich genug, um diesen Schluß zu rechtfertigen, aber auch hier ist die Größe der neu gebildeten Acetonmenge bei der leichten Flüchtigkeit des Aldehyds bemerkenswert.

Tabelle II.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durchblutungszeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Gesamtacetons mg	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons aus neugebildeter Acetessigsäure mg
6	2 g Acetaldehyd 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 2 g Natriumbicarbonat 1500 ccm Rinderblut	262	60	33,74	25,64
7	2 g Aldehydammoniak 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	170	76	64,63	58,95
8	2 g Aldehydammoniak 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	135	105	59,25	51,31
9	2 g Aldehydammoniak 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	160	81	66,84	—
10	2 g Aldehydammoniak 100 ccm Ringersche Lösung 1500 ccm Rinderblut	195	50	34,3	—

Einen Anhaltspunkt für den Weg, auf dem diese Synthese der Acetessigsäure aus Aldehyd bei der Durchblutung der Leber sich vollzieht, schien die bekannte Tatsache zu liefern, daß alkalisch reagierende Salze so wie andere Kondensationsmittel Aldehyd mit Leichtigkeit zum Aldol kondensieren, und es war daher zu prüfen, ob Aldol bei der Leberdurchblutung Aceton und Acetessigsäure bildet (Tabelle IV).

Tabelle III.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durchblutungszeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Gesamtacetons mg	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons aus neugebildeter Acetessigsäure mg
11	100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	200	81	18,45	(21,81)
12	100 ccm Ringersche Lösung 1500 ccm Rinderblut	290	50	8,26	(14,64)

Nach den Zahlen der Tabelle IV ist Aldol ein ausgezeichneter Bildner von Aceton und Acetessigsäure. Der chemische Vorgang, der sich hierbei abspielt, besteht in einer Oxydation einer sekundären Alkoholgruppe zur Ketongruppe und einer Aldehydgruppe zur Carboxylgruppe:

$$CH_3.CH(OH).CH_2.COH \rightarrow CH_3.CO.CH_2.COOH.$$

Tabelle IV.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durchblutungszeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Gesamtacetons mg	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons aus neugebildeter Acetessigsäure mg
13	2 g Aldol 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	—	95	131,29	44,7
14	2 g Aldol 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	—	87	109,86	(130,16)

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß von den untersuchten Substanzen mit zweigliedriger Kohlenstoffkette allein der Acetaldehyd bei der Leberdurchblutung zur Acetessigsäure synthetisiert

werden kann. Bei der chemisch leichten Kondensierbarkeit des Acetaldehyds zum Aldol, und der nachgewiesenen Bildung von Acetessigsäure aus Aldol, ist die Vermutung berechtigt, daß die Synthese der Acetessigsäure bei der Durchblutung aus Aldehyd über die Zwischenstufe des Aldols verläuft. Man kann demnach diese Reaktionskette in folgende Formeln kleiden:

$$\text{I. } CH_3.COH + CH_3.COH = CH_3.CH(OH).CH_2.COH.$$

$$\text{II. } CH_3.CH(OH).CH_2.COH + O = CH_3.CH(OH).CH_2.COOH.$$

$$\text{III. } CH_3.CH(OH).CH_2.COOH + O = CH_3.CO.CH_2.COOH + H_2O.$$

$$\text{IV. } CH_3.CO.CH_2.COOH = CH_3.CO.CH_3 + CO_2.$$

Der durch Gleichung I wiedergegebene Vorgang entspricht der Kondensation des Acetaldehyds zum Aldol, während die in Gleichung II und III ausgedrückten Vorgänge die Oxydation des Kondensationsproduktes bedeuten.

Für den Ort der Oxydation des Aldols kann bei der beschriebenen Versuchsanordnung nur die überlebende Leber in Betracht kommen, dagegen besteht für die Kondensation des Aldehyds zum Aldol die Möglichkeit, daß sie entweder im Blut oder in der Leber sich abspielt. Bei Versuchen, die ich nach dieser Richtung mit Leberbrei angestellt habe, habe ich keinen Anhaltspunkt dafür gewinnen können, daß die Leber als Ort dieser Kondensation in Betracht kommt. Dagegen habe ich nach Zusatz von Aldehydammoniak zum Blute die Möglichkeit einer sich hier abspielenden Kondensation nicht völlig ausschließen können. Es muß daher weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, die näheren Bedingungen der Reaktion aufzuklären und festzustellen, ob dieser Synthese eine Bedeutung für die Bildung der β-Oxybuttersäure im Tierkörper zukommt.

Methodik.

1. Allgemeine methodische Bemerkungen.

Die Versuchstiere hatten vor dem Versuch 24 Stunden gehungert. Die Entblutung wurde aus der Carotis vorgenommen. Das Blut wurde nach Schenk koaguliert und in je 500 ccm Filtrat die Bestimmungen ausgeführt. Es wurden stets Doppelbestimmungen ausgeführt.

Die Bestimmung des Gesamtacetons geschah im wesentlichen nach Messinger-Huppert. Da ich häufig bei den Versuchen Aldehyde oder Substanzen, die im Organismus möglicherweise zu Aldehyden oxydiert wurden, untersuchte, war es nötig, diese Substanzen, die bei der jodometrischen Bestimmung des Acetons zu fehlerhaften Zahlen geführt hätten, zu entfernen. Es wurden daher die Destillate mit Silberoxyd behandelt. Im einzelnen wurde hierbei in folgender Weise verfahren:

500 ccm Filtrat wurden auf ein Drittel ihres Volumens abdestilliert, das Destillat mit überschüssigem Silberoxyd versetzt und fünf Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Nach zwölfstündigem Stehen wurde vom Silberoxyd filtriert, das Silberoxyd mit Wasser ausgewaschen und von dem Filtrat nach Zusatz von 4 ccm 24 proz. Schwefelsäure zwei Drittel seines Volumens abdestilliert. In dem so gewonnenen Destillate wurde das Aceton nach Messinger-Huppert jodometrisch bestimmt.

Die als Gesamtaceton mitgeteilten Zahlen sind sämtlich auf diese Weise bestimmt.

Beim Schütteln mit Silberoxyd werden nur geringe Mengen von Aceton zerstört.

5 ccm einer verdünnten Acetonlösung wurden mit 500 ccm Wasser verdünnt und auf ein Drittel Volumen destilliert. Das Destillat wurde direkt titriert. Es wurden 7,20 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung verbraucht.

5 ccm derselben Acetonlösung wurden mit 500 ccm Wasser verdünnt und auf ein Drittel Volumen destilliert. Das Destillat wurde mit überschüssigem Silberoxyd fünf Stunden geschüttelt. Nach Filtration des Silberoxyds wurden 4 ccm 24 proz. Schwefelsäure hinzugefügt und von neuem destilliert. Das Destillat verbrauchte 6,80 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

Die Bestimmung der Acetessigsäure geschah nach den von Embden[1]) kürzlich gemachten Angaben.

5 ccm Acetonlösung, die 7,46 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung entsprachen, wurden im Vakuum nach der Vorschrift von Embden destilliert, der Rückstand auf ein Drittel Volumen destilliert und das Destillat titriert. Es wurden 0,65 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung verbraucht.

Zur Berechnung wurde der von 500 ccm Filtrat des Normalblutes verbrauchte Anteil $^1/_{10}$ n-Jodlösung sowohl von dem nach Behandeln mit Silberoxyd als Gesamtaceton ermittelten Wert wie von der nach Embden bestimmten Acetessigsäure in Abzug gebracht.

Es sei erwähnt, daß ein Teil der jodbindenden Substanz des Normalblutes von Silberoxyd zerstört wird. Nach dieser Richtung wurden drei verschiedene Blutproben untersucht.

---

[1]) Zentralbl. f. d. ges. Phys. u. Path. d. Stoffwechsels. N. F., 2, 250 u. 2, 290.

Blut I. a) 500 ccm Filtrat wurden destilliert, das Destillat direkt titriert. Verbraucht von $^1/_{10}$ n-Jodlösung 0,66 ccm. b) 500 ccm Filtrat wurden destilliert, das Destillat mit Silberoxyd geschüttelt und das Filtrat vom Silberoxyd destilliert und titriert. Verbraucht 0,37 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

Blut II. a) 500 ccm Filtrat, wie Blut I a) behandelt, verbrauchten 1,12 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung. b) 500 ccm Filtrat, wie Blut I b) behandelt, verbrauchten 0,43 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

Blut III. a) 500 ccm Filtrat, wie Blut I a) behandelt, verbrauchten 1,29 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung. b) 500 ccm Filtrat, wie Blut I b) behandelt, verbrauchten 0,60 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

Dieses Verhalten scheint darauf hinzudeuten, daß die im normalen Blute vorhandene jodbindende flüchtige Substanz nicht ausschließlich Aceton ist.

2. Methodische Bemerkungen zu Tabelle I.

Bei der jodometrischen Bestimmung des Acetons neben Äthylalkohol wurde hier wie bei allen übrigen Acetonbestimmungen die alkalische Hypojoditlösung genau fünf Minuten bei Zimmertemperatur auf das auf Aceton zu prüfende Destillat zur Einwirkung gebracht. Die Anwesenheit von Äthylalkohol neben Aceton bedingt unter diesen Umständen nur eine geringe Fehlerquelle für die quantitative Bestimmung des Acetons.

2 ccm Äthylalkohol wurden in 1500 ccm Wasser gelöst: a) 100 ccm dieser Lösung mit 400 ccm Wasser verdünnt, direkt titriert, verbrauchten 0,81 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung. b) 100 ccm dieser Lösung wurden mit 400 ccm Wasser verdünnt, destilliert und das Destillat filtriert. Es wurden verbraucht 0,81 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung. c) 100 ccm dieser Lösung wurden mit Wasser verdünnt, eine halbe Stunde bei 30° (5 mm) destilliert, der Rückstand wurde destilliert und das Destillat titriert. Es wurden verbraucht 0,43 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

Das zur Durchblutung verwandte Präparat von Äthylenglykol enthielt nur Spuren von jodbindender Substanz.

1,8 ccm Äthylenglykol wurden in 1500 ccm Wasser gelöst: 100 ccm dieser Lösung wurden mit 400 ccm Wasser verdünnt und direkt titriert. Es wurden verbraucht 0,55 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

100 ccm dieser Lösung wurden mit 400 ccm Wasser verdünnt, nach Zusatz von 4 ccm Schwefelsäure destilliert und das Destillat titriert. Es wurden verbraucht 0,49 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

3. Methodische Bemerkungen zu Tabelle II.

Es ist der Nachweis zu erbringen, daß Aldehyd durch Schütteln mit Silberoxyd quantitativ zerstört wird.

Zu diesem Zweck wurden 2 g Aldehydammoniak in 1500 ccm Wasser gelöst (Lösung I), von dieser Lösung 50 ccm mit 400 ccm Wasser verdünnt und nach Zusatz von 5 ccm 24 proz. Schwefelsäure destilliert. Das Destillat wurde titriert. Es wurden verbraucht 61,85 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

Es wurde außerdem eine verdünnte Lösung von Aceton dargestellt (Lösung II), von der 5 ccm 7,46 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung verbrauchten.

a) 5 ccm Acetonlösung (Lösung II) und 50 ccm Aldehydammoniaklösung (Lösung I) wurden mit 400 ccm Wasser verdünnt und nach Zusatz von 5 ccm 24 proz. Schwefelsäure destilliert. Das Destillat wurde fünf Stunden mit überschüssigem Silberoxyd geschüttelt und vom Silber und Silberoxyd nach 12 stündigem Stehen durch Filtration befreit. Das Filtrat wurde mit 5 ccm 24 proz. Schwefelsäure angesäuert und destilliert. Das Destillat verbrauchte 6,03 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

b) 5 ccm Acetonlösung (Lösung II) und 100 ccm Aldehydammoniaklösung (Lösung I) wurden in derselben Weise, wie unter a) beschrieben, behandelt. Es wurden verbraucht 6,27 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

Diese Zahlen zeigen, daß der Aldehyd durch Schütteln mit Silberoxyd vollständig zerstört wird. Auch vom Aceton wird bei Anwesenheit von Acetaldehyd durch Schütteln mit Silberoxyd ein Teil zerstört. Die in der Tabelle II als Gesamtaceton aufgeführten Zahlen sind daher Minimalzahlen und unter diesem Vorbehalte einwandsfrei.

Für die Bestimmung der Acetessigsäure war zu prüfen, ob Aldehyd neben Aceton unter den von Embden angegebenen Bedingungen im Vakuum vollständig flüchtig ist. Dies ist, wie der nachstehende Versuch zeigt, nicht der Fall.

5 ccm Acetonlösung (Lösung II) und 100 ccm Aldehydammoniaklösung (Lösung I) wurden mit 400 ccm Wasser verdünnt und nach Zusatz von 5 ccm 24 proz. Schwefelsäure eine halbe Stunde im Vakuum (30°, 5 mm) destilliert. Der Rückstand wurde destilliert und das Destillat titriert. Es wurden verbraucht 7,46 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

Aus diesem Grunde ist die Bestimmung der Acetessigsäure nur bei Abwesenheit von Aldehyd einwandsfrei. Dieser Bedingung entspricht Versuch 6, 7 und 8, da in diesen Fällen bei der Bestimmung des Gesamtacetons nach dem Schütteln mit Silberoxyd wie ohne Schütteln mit Silberoxyd dieselben Zahlen erhalten wurden. Dagegen war in Versuch 9 und 10 Aldehyd nachweisbar, weshalb die Bestimmungen der Acetessigsäure in diesen Fällen unberücksichtigt geblieben sind.

Im Versuch 9 und 10 konnte die Neubildung von Aceton außer auf jodometrischem Wege durch Bestimmung der Ausbeute an p-Nitrophenylhydrazon des Acetons vom Schmelzpunkt 148° festgestellt werden.

Unter genau gleichen Bedingungen lieferten

	p-Nitrophenylhydrazon
1 Liter Blut vom Versuch 9	44,5 mg
1 „ „ „ Kontrollversuch 11 .	24,3 „
1 „ „ „ Versuch 10	19,8 „
1 „ „ „ Kontrollversuch 12 .	0,0 „

4. Methodische Bemerkungen zu Tabelle III.

Die in Tabelle III mitgeteilten Zahlen scheinen zu zeigen, daß die als Acetessigsäure gefundenen Acetonmengen größer sind als die Gesamtacetonmenge. Dies ist natürlich unmöglich, die mitgeteilten Zahlen erklären sich vielmehr dadurch, daß ein Teil der flüchtigen, jodbindenden Substanzen, die bei der Durchblutung der normalen Leber entstehen, durch Silberoxyd zerstört werden, also kein Aceton sind. Es würde sich im Versuch 11 die Neubildung der Gesamtmenge Aceton ohne Schütteln mit Silberoxyd zu 28,63 mg und im Versuch 12 zu 16,83 mg ergeben. Demnach sind im Versuch 11 10,28 mg und im Versuch 12 8,57 mg (beides als Aceton berechnet) gebildet worden, die kein Aceton sind.

5. Methodische Bemerkungen zu Tabelle IV.

Die Zerstörung durch Schütteln mit Silberoxyd, die beim Aldehyd vollen Erfolg hatte, war beim Aldol keine vollständige.

2 g frisch im Vakuum destillierten Aldols wurden in 1500 ccm Wasser gelöst:

10 ccm dieser Lösung wurden mit 500 ccm Wasser verdünnt, destilliert und das Destillat titriert. Es wurden verbraucht 10,91 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

50 ccm dieser Lösung wurden mit 500 ccm Wasser verdünnt und destilliert. Das Destillat wurde mit Silberoxyd geschüttelt und in der beim Acetaldehyd beschriebenen Weise aufgearbeitet. Es wurden verbraucht 6,61 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

10 ccm dieser Lösung wurden mit 500 ccm Wasser verdünnt und im Vakuum 30 Minuten (30°, 5 mm) destilliert. Der Rückstand wurde destilliert und das Destillat titriert. Es wurden verbraucht 9,72 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung.

In diesem Falle sind also weder die als Gesamtaceton, noch die als Acetessigsäureaceton angegebenen Zahlen einwandsfrei. Berücksichtigt man aber, daß die ohne Schütteln mit Silberoxyd erhaltenen Titrationswerte einer Gesamtacetonvermehrung von 141,9 mg gegen 131,29 mg nach dem Schütteln mit Silberoxyd im

Versuch 13 und in derselben Weise 140,26 mg gegen 109,86 mg im Versuch 14 entsprechen, so können die Versuchsfehler kaum erhebliche sein.

Einwandsfrei konnte die Vermehrung des Acetons im Blute nach Durchströmung der überlebenden Leber im Versuch 14 festgestellt werden, indem die Ausbeute an p-Nitrophenylhydrazon des Acetons in einem Liter Durchblutungsblut bestimmt wurde. Diese beträgt 85,7 mg oder das Dreieinhalbfache der im Normalversuch 11 erhaltenen Ausbeute.

XIV.

Über die fermentative Veränderung der Glyoxylsäure durch Organbrei.

Von Dr. **E. Granström** (St. Petersburg).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Aus meiner vor kurzem erschienenen Mitteilung[1]) geht hervor, daß die Indolprobe auf Glyoxylsäure trotz ihrer außerordentlichen Empfindlichkeit nicht für den positiven Nachweis genügt; hingegen berechtigt, wie auch Adler[2]) betont, ihr Fehlen zu dem Schlusse, daß irgend merkliche Mengen von Glyoxylsäure nicht vorhanden sind. Danach ist die Indolprobe ein wertvolles Hilfsmittel, die Umwandlung der Glyoxylsäure zu verfolgen. Wie alle Beobachter bisher festgestellt haben, wird Glyoxylsäure im Tierkörper sehr rasch zerstört, d. h. so verändert, daß sie durch keine Reaktion, auch nicht durch die Indolreaktion nachgewiesen werden kann. Die Veränderung, die sie dabei erfährt, ist nur insofern bekannt, als aus den Versuchen Pohls[3]), Eppingers[4]) und Adlers hervorgeht, daß sie, innerlich eingeführt, zu einer Vermehrung der Oxalsäureausscheidung führt, als ferner sowohl Eppinger wie auch später Adler daneben eine allerdings nicht beträchtliche Vermehrung der Allantoinausscheidung im Harn gefunden haben, die Eppinger auf eine synthetische Allantoinbildung aus Glyoxylsäure bezieht.

Was den Ort der Umwandlung der Glyoxylsäure im Tierkörper anlangt, geben Organbreiversuche von Schloss[5]) einen

---

[1]) Diese Beiträge 11, 132.
[2]) Adler, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 56, 202.
[3]) Pohl, ebenda 37, 413.
[4]) Eppinger, diese Beiträge 6, 492.
[5]) Diese Beiträge 8, 445.

Hinweis. Diesem zufolge wird die Glyoxylsäure am stärksten von der Leber zerstört. Dann folgen, nach ihrer Wirkung auf die Glyoxylsäure geordnet, Gehirn, Nieren und Muskeln, Lunge und Milz. Dem Blute scheint die Wirkung auf die Glyoxylsäure zu fehlen.

1. Versuche zur Isolierung des die Glyoxylsäure umwandelnden Fermentes.

Ich versuchte mit verschiedenen Methoden die Glyoxylase, wie ich das die Glyoxylsäure verändernde Agens des Leberbreies vorläufig der Kürze wegen nennen will, möglichst frei von Beimengungen zu erhalten.

Von den zur Isolierung von Fermenten empfohlenen Fällungsmethoden habe ich die Alkohol-, Aceton-, Uranylacetat- und Ammonsulfatfällung angewandt.

Die mit Quarzsand zerriebene Rindsleber wurde mit dem gleichen Volumen Ringerscher Lösung auf der Schüttelmaschine geschüttelt und koliert. Die ganz trübe Flüssigkeit, welche gewöhnlich die Glyoxylsäure ebenso rasch veränderte wie der Leberbrei selbst, wurde mit den genannten Fällungsmitteln gefällt und der Niederschlag mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Um eine möglichst gute Ausbeute an Glyoxylase zu erhalten, wurden alle Manipulationen so schnell als möglich ausgeführt: 1. weil von verschiedenen Autoren, unter anderen von Jacoby[1]) für die Aldehydase, angegeben wird, daß die Fermentausbeute desto geringer wird, je später das Ferment aus dem Niederschlage extrahiert wird, und 2. weil Vorversuche gezeigt hatten, daß die Glyoxylase sehr wenig beständig ist. Läßt man die trübe Flüssigkeit oder die verriebene Leber auf Eis oder bei Zimmertemperatur, bei neutraler oder bei schwach alkalischer Reaktion stehen, so verschwindet das Vermögen, die Glyoxylsäure zu zerstören, meist schon nach 1 bis 2 Tagen.

Die Fällungen mit Alkohol und mit Aceton wurden teils mit kleinen Mengen (dem gleichen oder zweifachen Volumen), teils mit großen Mengen (dem 10 bis 12fachen Volumen) absoluten Alkohols und Acetons ausgeführt[2]). In den Niederschlägen konnte die Glyoxylase nachgewiesen werden, die Wirkung war aber immer schwächer, als die der entsprechenden Menge der ursprünglichen trüben Flüssigkeit.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 142 (1900).
[2]) Buchner und Hahn: Zymasegärung. 1900.

Die Niederschläge, welche durch Zusatz großer Mengen Alkohol oder Aceton erhalten wurden, waren fast immer merklich wirksamer, als die mit kleineren Mengen der Fällungsmittel erhaltenen. Bei fraktionierter Fällung mit Alkohol oder Aceton waren die späteren Fraktionen meist wirksamer als die ersten Niederschläge, aber immer viel weniger wirksamer als die ursprüngliche Flüssigkeit. Die Filtrate nach Entfernen des Alkohols und Acetons im Vakuum bei 30° waren unwirksam. Die Acetonniederschläge waren fast immer wirksamer als die Alkoholfällungen, was wohl auf eine raschere Zerstörbarkeit des Fermentes durch Alkohol hindeutet.

Mit Uran wurde nach der von Jacoby und Rosell[1]) beschriebenen Methode verfahren. Die Uranniederschläge, mit Ringerscher Lösung und glyoxylsaurem Natron verrieben, zerstörten die Glyoxylsäure meist etwa so stark wie die Acetonniederschläge, waren also auch weniger wirksam als die ursprüngliche Flüssigkeit.

Es gelang nicht, die Glyoxylase aus diesen Niederschlägen zu extrahieren. Die Niederschläge wurden mit Ringerscher Lösung, 0,2 proz. Sodalösung, 0,9 proz. Natriumchloridlösung, destilliertem Wasser, 5 proz. Harnstofflösung, 5 proz. Glycerinlösung verrieben und einige Stunden auf Eis stehen gelassen. Dann wurden die Niederschläge, sowie die abfiltrierte Flüssigkeit auf Glyoxylase untersucht. Die Niederschläge zerstörten noch die Glyoxylsäure, aber schwächer als gleich nach der Fällung, die Filtrate waren unwirksam.

Es ist noch hinzuzufügen, daß es nicht immer gelingt, gleich wirksame Niederschläge durch Fällung mit Alkohol, Aceton oder Uranylacetat zu erhalten. Die Wirksamkeit der Niederschläge wechselt trotz anscheinend gleicher Darstellungsbedingungen.

Die Fällung mit Ammonsulfat wurde nach der von Jacoby[2]) für die Isolierung der Aldehydase empfohlenen Methode ausgeführt. Die Niederschläge und das Filtrat wurden einige Stunden gegen Ringersche Lösung dialysiert und darauf auf ihr Vermögen, Glyoxylsäure zu zerstören, untersucht. Die Niederschläge und Filtrate waren unwirksam.

Ich versuchte noch, das Ferment nach der von Wiechowski[3]) für das Harnsäure zerstörende Enzym beschriebenen Methode zu isolieren. Nach der Toluolextraktion war die Fermentwirkung des rasch getrockneten Leberpulvers geringer als in der frischen Leber; die Fermentwirkung nahm bei Extraktion des Leberpulvers mit Aceton, dem $^1/_5$ Volumen Toluol zugefügt war, noch weiter ab. Nach einem Monat war das Vermögen, Glyoxylsäure zu zerstören, fast ganz verschwunden.

---

[1]) M. Rosell, Über Nachweis und Verbreitung intrazellulärer Fermente. Diss. Straßburg i. E. 1901.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 137 (1900).

[3]) Diese Beiträge 9, 232.

Ein nur mit Toluol extrahiertes Leberpulver von einer anderen Darstellung erwies sich von vornherein als wenig wirksam.

Hingegen büßte ein Niederschlag, welcher durch Fällung der Leberflüssigkeit mit dem 10 fachen Volumen Aceton erhalten und rasch getrocknet worden war, nur langsam an Wirksamkeit ein. Er war noch nach einigen Monaten aktiv.

2. Zur Charakteristik der Glyoxylase.

Da ich bei den Versuchen, das Ferment zu isolieren, immer nur Präparate erhielt, welche von vornherein vier- bis achtmal weniger wirksam waren als die frische Leber und beim Aufbewahren noch weiter an Wirksamkeit verloren, so habe ich die Eigenschaften der Glyoxylase an frischer Rindsleber zu studieren versucht.

Die ganz frische Rindsleber wurde von gröberen Stücken Bindegewebe befreit, in der Fleischhackmaschine zerkleinert und mit Quarzsand verrieben. Mit dem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung oder Ringerscher Lösung gemischt zerstörte die Leber das ihr im Verhältnis 4 : 1000 des Gewichtes zugefügte glyoxylsaure Natron bei 37° in 4 Stunden vollständig. Fast immer war schon nach 1 bis $1^1/_2$ Stunden diese Menge Glyoxylsäure bis auf Spuren verschwunden. (Um eine bessere Mischung des Leberbreies mit dem glyoxylsauren Natron zu ermöglichen, wurde physiologische Kochsalzlösung oder Ringersche Lösung zugefügt.) Nach abgeschlossener Digestion bei 37 bis 40°, während welcher die Flüssigkeiten mehrmals durchgeschüttelt wurden, wurde das Eiweiß durch Zusatz von $^1/_3$ bis $^1/_2$ Volumen 24 proz. Schwefelsäure ausgefällt.

Schloss hat empfohlen, die Ausfällung mit konzentrierter Trichloressigsäure auszuführen. Es scheint aber, daß die Trichloressigsäure in dieser Beziehung keine Vorzüge vor der Schwefelsäure hat. Bei der Koagulation mit Trichloressigsäure bekommt man meistens trübe, oft fast milchige Lösungen, während man nach der Ausfällung mit Schwefelsäure durch Filtration viel öfter klare, oder fast klare Lösungen erhält. Außerdem bildet sich bei der Unterschichtung mit konzentrierter Schwefelsäure in der Trichloressigsäure enthaltenden Lösung eine Schicht von braunen, beim Vorhandensein von Glyoxylsäure braunroten oder roten Tropfen, welche bei geringen Mengen Glyoxylsäure die Abschätzung erschweren. Bei Ausfällung mit Schwefelsäure fehlt diese Erscheinung.

Nach Koagulation mit Schwefelsäure und Filtration wurde Indollösung zugefügt, die Flüssigkeit mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet und mit den Kontrollproben verglichen. Zur

Kontrolle wurden gleich nach dem Mischen des Leberbreies mit Glyoxylsäure 10 bis 15 ccm abgegossen und sofort mit dem halben Volumen 24 proz. Schwefelsäure versetzt, wodurch die Fermentwirkung aufgehoben und gleichzeitig das Eiweiß entfernt wird.

Zur Feststellung der Temperatur, bei welcher die Glyoxylase zerstört wird, wurden Proben von Leberbrei mit einem Volumen Ringerscher Lösung gemischt und 10 Minuten lang im Wasserbade auf 50, 60, 70, 80 und 90° erwärmt. Darauf wurden die Proben mit glyoxylsaurem Natron im Verhältnis 2:1000 gemischt und nach vierstündiger Digestion im Brutschrank mit den Kontrollproben verglichen. Die auf 80 und 90° erwärmten Proben zeigten keine Abnahme der Glyoxylsäurereaktion, die Fermentwirkung war also aufgehoben. In den auf 70° erwärmten Proben war die Glyoxylsäurereaktion deutlich, aber geringer als in der Kontrollprobe. In den auf 50 und 60° erwärmten Proben war keine Glyoxylsäurereaktion vorhanden, ebensowenig in den nicht erwärmten Proben.

Das Temperaturoptimum für die Glyoxylase liegt ungefähr von 35 bis 40°; bei Temperaturen von 18 bis 20° einerseits, von 50° andererseits ist die Wirkung des Fermentes bereits merklich geringer.

Zur Untersuchung des Einflusses der Reaktion wurden zweierlei Versuche angestellt, von denen ich je einen von jedem Typus anführe.

1. Vorbehandlung der Fermentlösung mit Säure und Alkali.

30 g des mit Quarzsand verriebenen Leberbreies werden mit 30 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge bzw. Schwefelsäure verrührt. Nach 5 Minuten Alkali- bzw. Säurewirkung wird mit Lauge bzw. Säure genau neutralisiert und 0,06 g glyoxylsaures Natron, also im Verhältnis 2:1000, zugesetzt. Nach 5 Stunden bei 40° ist die Glyoxylsäure in allen Proben total zerstört.

Nach 10 Minuten langer Einwirkung derselben Menge $^1/_{10}$ n-Natronlauge bzw. Schwefelsäure und unter sonst gleichen Versuchsbedingungen erhält man mit Indol noch Spuren Rosafärbung. In mehreren Versuchen war die Reaktion nach Säureeinwirkung besser erhalten als nach Alkalieinwirkung.

2. Einfluß alkalischer und saurer Reaktion während der Digestion. Zusatz von glyoxylsaurem Natron im Verhältnis 2:1000.

a) 30 g Leberbrei werden mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 20 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure innig verrieben, dann mit 0,06 g glyoxylsauren Natrons versetzt. Nach 4 Stunden bei 40° eine viel schwächere Reaktion auf Glyoxylsäure als in der Kontrolle.

b) 30 g Leberbrei werden mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung verrieben, mit Essigsäure bis zu schwach saurer Reaktion, dann mit 0,06 g

glyoxylsauren Natrons versetzt. Nach 4 Stunden bei 40° eine sehr schwache Glyoxylsäurereaktion.

c) 30 g Leberbrei werden mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 30 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge verrieben, dann mit 0,06 g glyoxylsauren Natrons versetzt. Nach 4 Stunden nur eine Spur Reaktion.

d) 30 g Leberbrei werden mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 10 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge verrieben, dann mit 0,06 g glyoxylsauren Natrons versetzt. Nach 4 Stunden ist die Glyoxylsäure total zerstört.

e) Um festzustellen, ob die Glyoxylsäure vielleicht durch die Alkaliwirkung allein bei 40° zerstört wird, werden 60 ccm physiologischer Kochsalzlösung mit 30 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge und 0,06 g glyoxylsauren Natrons 4 Stunden bei 40° gehalten. Es ist keine Abnahme der Glyoxylsäure im Verhältnis zur Kontrollprobe erkennbar.

Von verschiedenen Antiseptica wurden betreffs ihres Einflusses auf die Glyoxylase Toluol, Chloroform, Blausäure, Chinin und Fluornatrium untersucht.

Je 30 g Leberbrei wurden a) mit 1 ccm Toluol und 30 ccm Ringerscher Lösung, b) mit 2 ccm Chloroform und 30 ccm Ringerscher Lösung, c) mit 30 ccm 2 proz. Blausäure und 0,03 g Kochsalz, d) mit 30 ccm 2 proz. Lösung von Chininum hydrochloricum, e) mit 30 ccm 5 proz. Fluornatriumlösung und f) mit 30 ccm 8 proz. Fluornatriumlösung innig gemischt, dann wurde glyoxylsaures Natron in der Proportion von 4 auf 1000 Leberbrei zugefügt.

Nach 4 Stunden bei 40° war in allen Proben die Glyoxylsäure zerstört, ebenso wie in der Kontrollprobe, welche keinen antiseptischen Zusatz erhalten hatte.

Dasselbe Resultat erhielt ich in einer Versuchsreihe, wo ich statt der frischen Leber die Versuche mit dem nach Wiechowsky dargestellten Leberpulver ausführte.

Bei einem Verhältnis von 5 Teilen glyoxylsauren Natrons auf 1000 Teile Leberbrei war in den Proben mit Zusatz der Antiseptica, ebenso wie in der Kontrollprobe ohne Antiseptica, nach 4 Stunden nur eine sehr schwache Glyoxylsäurereaktion vorhanden.

Da es sich bei diesen Versuchen herausstellte, daß die Glyoxylase gegen Säure- und Alkalieinwirkung, wie auch gegen Antiseptica relativ beständig ist, in der Leber aber spontan nach 1 bis 2 Tagen verschwindet, so ergab sich die Frage, ob die Glyoxylase nicht vielleicht durch die autolytischen Fermente der Leber zerstört werde. Wie der nachstehende Versuch zeigt, ist dies, wenigstens bei kurzer Einwirkung, nicht der Fall.

Es wurden gleiche Volumina frischen Leberbreies bzw. Leberflüssigkeit (durch Schütteln des Leberbreies mit dem gleichen Volumen Ringerscher Lösung und Zentrifugieren gewonnen) mit den gleichen Volumina von seit 3 und 7 Tagen im Brutofen unter Toluol gehaltenen autolytischen Flüssigkeiten nach vorgängigem Neutralisieren gemischt, dann 10 Minuten bzw. 30 Minuten mit glyoxylsaurem Natron im Verhältnis von 4 g auf 1000 g Leber

versetzt. Nach 4 Stunden bei 40° war in allen Proben die Glyoxylsäure völlig zerstört.

Da die nach Wiechowsky dargestellten Leberpulver gegenüber Glyoxylsäure fast unwirksam waren, so untersuchte ich, ob diese Pulver noch die Fähigkeit besaßen, harnsaures Natron zu zerstören.

a) 5 g Leberpulver wurden mit 30 ccm Ringerscher Lösung und 0,2 g darin gelösten harnsauren Natrons 4 Stunden im Brutschrank unter häufigem Umschütteln in bis zur Hälfte gefüllten Flaschen stehen gelassen. Dann wurde die unzerlegte Harnsäure nach Ludwig-Salkowski bestimmt.

b) 20 g frischen Leberbreies wurden mit 10 ccm Ringerscher Lösung und 0,2 g harnsauren Natrons 4 Stunden im Brutschrank unter ebenso häufigem Umschütteln stehen gelassen.

Das Leberpulver hatte 47,6 Proz., die frische Leber 45,8 Proz. der zugefügten Harnsäure zerstört.

In einem zweiten gleichen Versuch zerstörten 5 g Leberpulver 51,7 Proz. und 20 g des frischen Leberbreies 54,2 Proz. der zugefügten Harnsäure. Dabei zerstörte die frische Leber das ihr in der Proportion 4 : 1000 zugefügte glyoxylsaure Natron total in 4 Stunden, wogegen in der Probe des Leberpulvers nur eine geringe Abnahme der Glyoxylsäurereaktion im Verhältnis zur Kontrolle vorhanden war.

Danach ist die Glyoxylase nicht mit dem Harnsäure zerstörenden Fermente identisch. Für diese Verschiedenheit sprechen auch die folgenden Versuche über den Einfluß des Sauerstoffs.

Frischer Rindsleberbrei wurde mit dem gleichen Volumen Ringerscher Lösung $1/2$ Stunde geschüttelt, zentrifugiert und von der ganz trüben Leberflüssigkeit wurden in vier Einschmelzröhren von 55 bis 60 ccm Inhalt je 20 ccm eingefüllt, dann wurde bis auf 2 bis 3 mm Hg evakuiert. Darauf wurden in kleinen Röhrchen 0,08, 0,04, 0,02, 0,01 g glyoxylsaures Natron gelöst in die Röhren eingeführt, die Röhren wiederum evakuiert, während des Evakuierens zugeschmolzen und erst darauf die Leberflüssigkeit mit dem glyoxylsauren Natron gemischt. Als Kontrolle dienten Proben, welche dieselben Mengen Leberflüssigkeit mit den gleichen Mengen glyoxylsauren Natrons enthielten und im Brutschrank ebenso oft geschüttelt wurden, wie die evakuierten Röhren. Nach 4 Stunden wurden die Röhren geöffnet und ihr Inhalt ebenso, wie auch der der Kontrollproben, sogleich mit je 10 ccm 24 proz. Schwefelsäure gemischt. In drei dieser Versuche war in den Kontrollproben und auch in den evakuierten Röhren die ganze Glyoxylsäure zerstört worden, im vierten Versuche war die Glyoxylsäure überall verschwunden, außer in der Probe, wo 0,08 g glyoxylsaures Natron in die evakuierte Röhre eingeführt worden war; in dieser Probe war noch eine sehr schwache Glyoxylsäurereaktion vorhanden.

In einem fünften Versuche wurde durch die Kontrollprobe Luft durchgeleitet, die Hauptprobe wurde bis auf 18 mm Hg evakuiert, dann das Rohr mit Kohlensäure gefüllt, dann wiederum evakuiert, sodann wurde während des Versuches gewaschene, durch alkalische Pyrogallollösung geleitete Kohlensäure durchgeleitet. In einer Probe, wo 0,4 g glyoxylsaures Natron auf

100 g Leberflüssigkeit zugefügt war, war in 4 Stunden bei 40° die ganze Glyoxylsäure zerstört, ebenso wie in der Kontrollprobe. In einer Probe, wo 0,6 g glyoxylsaures Natron auf 100 g Leberflüssigkeit zugefügt war, ergab sich nur eine schwache Glyoxylsäurereaktion, ebenso wie in der Kontrollprobe.

Bekanntlich ist es sehr schwierig, bei ähnlichen Experimenten jede Spur Sauerstoff auszuschließen. Trotzdem scheinen mir die angeführten Versuche sehr deutlich gegen eine Rolle des Sauerstoffs bei dem Verschwinden der Glyoxylsäure zu sprechen. Denn die Oxydation von 0,4 g Natriumglyoxylat, selbst wenn sie bloß zu saurem Natriumoxalat geführt hätte, würde nicht bloß Spuren, sondern nicht weniger als etwa 0,067 g = 47 ccm Sauerstoff erfordert haben.

Dieses Verhalten spricht gegen eine Identifizierung der Glyoxylase mit dem Harnsäure zerstörenden Fermente, denn Wiechowsky und Wiener[1]) haben gefunden, daß die Harnsäure unter Sauerstoffabschluß fast gar nicht zerstört wird: Von 0,2 g harnsauren Natrons (= 0,14 g Harnsäure) wurden nach dreimaligem Evakuieren, Füllen der Flasche mit Kohlensäure und vierstündigem Schütteln bei 40° nur 0,02 g Harnsäure zersetzt, während beim Schütteln mit Luft in derselben Zeit 0,13 bis 0,14 g Harnsäure zerstört wurden.

3. Wird die Glyoxylsäure durch die Glyoxylase in Oxalsäure übergeführt?

Das unerwartete Resultat, daß zur Zersetzung der Glyoxylsäure durch die Glyoxylase Sauerstoffzutritt nicht nötig ist, stimmt mit dem überein, was ich über die chemische Umwandlung der Glyoxylsäure durch das Leberferment ermitteln konnte.

Im Hinblick auf die oben angeführten Befunde Pohls, Eppingers und Adlers war zu erwarten, daß die Glyoxylsäure durch das Leberferment zu Oxalsäure oxydiert würde. Außerdem ist ja bekannt, daß die Glyoxylsäure auch außerhalb des Tierkörpers leicht in Oxalsäure übergeht; so entsteht sie aus Glyoxylsäure bei der Oxydation, ja schon beim Kochen mit Alkali.

Ich habe in vier Versuchen den Nachweis der Oxalsäurebildung zu führen getrachtet. In den ersten zwei Versuchen kamen je 30 g Leberbrei und 0,06 g Natriumglyoxylat und je eine Kontrollprobe von 30 g Leberbrei zur Verwendung. Nach vierstündiger Digestion bei 40°, als jede Glyoxylsäurereaktion verschwunden war, wurden beide Proben durch Kochen koaguliert, die Coagula mit schwacher Salzsäure ausgezogen, Auszug und

---

[1]) Diese Beiträge 9, 247.

Koagulationsfiltrat vereinigt und die neutralisierte eingeengte Lösung durch Fällung mit Calciumchlorid und Extraktion des in Salzsäure gelösten Niederschlages mit Äther auf Oxalsäure untersucht — in beiden Proben ohne Erfolg.

Zwei weitere Versuche, die mit je 100 g Leberbrei, 0,4 g Natriumglyoxylat und fünfstündiger Digestion ausgeführt wurden, führten bei sorgfältigstem Arbeiten zu dem gleichen Resultat.

Die Tatsache, daß sich nach Verschwinden der Glyoxylsäure im Leberbrei keine Oxalsäure nachweisen läßt, steht im Einklang mit dem obigen Befunde, daß sich dieses Verschwinden auch bei Abwesenheit von Sauerstoff vollzieht. Danach besitzt der Organismus, wenigstens die Leber, die Fähigkeit, die Glyoxylsäure noch in anderer Art als durch Oxydation zum Verschwinden zu bringen. Man kann vermuten, daß diese Art des Abbaues auch für den Fall, daß intermediär im Tierkörper Glyoxylsäure auftritt, die gewöhnliche sein dürfte.

Da die Oxalsäure im Tierkörper, wie wir seit Gaglio und Pohl wissen, gar nicht oder nur in minimalen Mengen zersetzt wird, so würde, falls die Glyoxylsäure im Organismus nachweisbar zu Oxalsäure umgewandelt würde, der verschwindend geringe Gehalt des Harns an Oxalsäure dafür sprechen, daß Glyoxylsäure im intermediären Stoffwechsel nicht in merklicher Menge auftritt. Wenn aber die Glyoxylsäure nicht oder nur zu einem kleinen Teil in Oxalsäure übergeht, so ist die Möglichkeit des Entstehens der Glyoxylsäure im intermediären Stoffwechsel vorläufig nicht von der Hand zu weisen.

Ich habe noch Versuche angestellt, ob aus Glykolsäure, Allantoin und Harnsäure bei der Digestion mit Leberbrei Glyoxylsäure entsteht.

Eppinger und Schloss[1]) haben bei der Oxydation von Glykolsäure, beim Kochen von Allantoin mit Alkali, und Almagia[2]) und Schloss nach dem Digerieren von Harnsäure mit Kalilauge eine positive Indolreaktion beobachtet.

Ich habe nach der Digestion von 30 g Leberbrei mit 0,1 g Allantoin und 30 g Leberbrei mit 0,2 g glykolsauren Natrons keine positive Indolreaktion erhalten, ebensowenig bei der Digestion von 30 g Leberbrei und 0,2 g harnsauren Natrons.

Endlich sei noch ein Versuch angeführt, der ausgeführt wurde, um zu sehen, ob die Phosphorvergiftung die Glyoxylasewirkung der Leber beeinflußt.

---

[1]) l. c.
[2]) Diese Beiträge 7 472

Einem Hunde wurde täglich gesättigtes Phosphoröl injiziert. Er starb am sechsten Tage. Am dritten und am fünften Tage nach dem Beginn der Phosphorinjektionen wurden ihm 2 g bzw. 3 g Calciumglyoxylat gelöst per os eingegeben. Im Harn wurde keine Glyoxylsäure gefunden. Die 3 Stunden nach dem Tode entnommene stark verfettete Leber zerstörte die im Verhältnis 4 : 1000 zugefügte Glyoxylsäure ebenso rasch, wie die normale Leber.

Dieser negative Befund ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, daß die Phosphorvergiftung in der Leber hauptsächlich zu einer Vermehrung autolytischer Fermente führt, diese aber, wie oben gezeigt wurde, die Glyoxylase nicht merklich schädigen.

Aus den eben angeführten Untersuchungen ist zu schließen, daß die Glyoxylase der Leber nicht mit der Aldehydase identisch ist. Es folgt dies einerseits aus den erfolglosen Versuchen, die Glyoxylase nach der von Jacoby für die Aldehydase beschriebenen Methode darzustellen, andererseits daraus, daß die Glyoxylase zu ihrer Wirkung anscheinend nicht des Sauerstoffs bedarf, vermutlich somit überhaupt kein oxydierendes Ferment ist; sie ist auch nicht mit dem Harnsäure zerstörenden Fermente Wiechowskys identisch, denn ich habe Leberpräparate erhalten, die gegen Glyoxylsäure fast unwirksam waren, Harnsäure aber energisch, ungefähr wie die frische Leber, zersetzten. Außerdem bedarf das Harnsäure zersetzende Ferment des Sauerstoffs zu seiner Wirkung.

Da die Glyoxylsäure im Leberbrei nicht nachweisbar zu Oxalsäure oxydiert wird, so muß es sich um andere chemische Umwandlungen handeln. Dabei ist im Hinblick auf ihre Aldehydnatur wohl in erster Reihe an synthetische Vorgänge zu denken, worauf schon Eppingers Allantoinversuche hinweisen. Doch fehlt es zu einer endgültigen Schlußfolgerung noch an ausreichenden Beweisen.

Die Glyoxylase ist nach ihrem ganzen Verhalten ein intrazelluläres Ferment. Sie ist so fest an Zellreste und Zellen gebunden, daß es nicht gelingt, sie davon zu trennen. Dementsprechend konnte sie nicht in klarer Lösung erhalten werden. Auch beim Filtrieren der Leberflüssigkeit durch das Chamberlandfilter wird die Glyoxylase zurückgehalten.

XV.

Zur Kenntnis des Eiweiß- und Mineralstoffwechsels pankreasdiabetischer Hunde.

Von Privatdozent Dr. **W. Falta** (Wien)
und
Dr. **James Lyman Whitney** (Branford, Conn. U. S. A.).

(Aus der ersten medizinischen Universitätsklinik in Wien. Vorstand Prof. C. von Noorden.)

Vor kurzem haben Falta, Grote und Stähelin[1]) darauf hingewiesen, daß bei Hunden nach der Exstirpation des Pankreas eine enorme Steigerung der Hunger-Eiweiß-Zersetzung eintrete, deren Ursache ähnlich wie bei derjenigen, welche bei maximaler Phlorizinvergiftung auftritt, hauptsächlich in dem Ausfall der Kohlehydrate zu suchen ist. In den erwähnten Versuchen ließ sich jedoch nicht mit voller Sicherheit ausschließen, ob nicht infektiöse Prozesse, wenn auch nur in geringem Grade, an dieser Steigerung des Eiweißumsatzes mitbeteiligt waren.

Wir haben daher diese Versuche wiederholt und dabei auch die Salzausfuhr studiert. Es war ja natürlich zu erwarten, daß mit der Mehreinschmelzung von Körpereiweiß auch mehr Salze zur Ausscheidung gelangen würden. Es schien uns aber die Frage doch von Interesse, ob die Beziehungen, welche bei normalen hungernden Hunden zwischen Eiweißumsatz und Aschenausfuhr durch den Harn bestehen, beim experimentellen Diabetes dieselben bleiben.

Methodik.

Bei den betreffenden Hunden wurde zuerst während einer vier bis fünftägigen Hungerperiode Stickstoff- und Salzausscheidung im Harn untersucht. Dann wurden die Hunde durch mindestens

---

[1]) Falta, Grote und Stähelin, Versuche über Stoffwechsel- und Energieverbrauch an pankreaslosen Hunden. Diese Beiträge 10 (1907).

acht Tage reichlich gefüttert. Am Tage vor der Operation erhielten sie bloß Milch. Am Tage der Operation selbst hungerten sie. Die Operationen wurden von Herrn Privatdozent Dr. Clairmont, Assistenten der ersten chirurgischen Universitätsklinik in Wien, ausgeführt. Wir sagen ihm hiermit für seine liebenswürdige Unterstützung unseren herzlichen Dank. Es wurde stets nur in Äthernarkose operiert. Nach der Exstirpation des Pankreas wurde die Bauchhöhle mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, dann die Bauchwunde durch Etagennaht geschlossen. Die Werte für die NaCl-Ausscheidung im Harn sind daher an den ersten zwei Tagen nach der Operation für unseren Zweck nicht zu gebrauchen. Es sei gleich erwähnt, daß sich bei der Sektion der Hunde niemals Reste von Pankreasgewebe fanden. Die Bauchwunde erwies sich immer als glatt verheilt. Betreffs der Temperatur siehe die umstehende Tabelle.

Wir haben im ganzen vier Versuche ausgeführt. Sie ergaben im großen Ganzen übereinstimmende Resultate. Es genügt daher, nur einen dieser Versuche genauer zu beschreiben.

Versuchsprotokoll Nr. IV. 18 kg schwerer Pudel.

A. Hungerperiode.

N-Ausscheidung: Erst Abfall, dann allmählicher geringer Anstieg.

P_2O_5-Ausscheidung: Dasselbe.

N : P_2O_5: Erst Abfall, bleibt dann konstant.

NaCl: Erst starker Abfall, dann allmählicher geringer Anstieg.

CaO: Zeigt ein anderes Verhalten, als die bisher beschriebenen Harnbestandteile. Zuerst sehr niedrige Werte, dann allmählicher Anstieg bis auf das Doppelte.

Gesamtasche: Hier ist der anfängliche Abfall und der spätere Anstieg am deutlichsten ausgesprochen.

N : Gesamtasche: Erst Anstieg, dann deutlich ausgesprochener Abfall.

Körpergewichtsabnahme: Zeigt dieselbe Kurve, wie die Ausscheidung des Stickstoffs und der meisten Mineralbestandteile; pro die 280, 180, 290, 360; in Mittel pro die 270.

B. Nach der Pankreasexstirpation.

D-Ausscheidung: Sofort rascher Anstieg; von der 14. bis zur 38. Stunde werden bereits 38 g D ausgeschieden. D bleibt dann konstant.

N-Ausscheidung: Ebenso rascher Anstieg; von der 14. bis zur 38. Stunde nahezu 12 g N. N bleibt dann konstant.

Quotient D : N: Beträgt schon in den ersten 14 Stunden 2,35, erhält sich dann auf voller Höhe zwischen 2,88 und 3,18. Die Hungereiweißzersetzung ist demnach um das 3,1fache gesteigert.

NaCl: Es ist anzunehmen, daß die NaCl-Ausfuhr ebenso gesteigert ist wie die N-Ausscheidung, da die Werte am 3. und 4. Hungertage von der Kochsalzinfusion kaum mehr wesentlich beeinflußt sein dürften.

Datum Juni 1907	N	Harn-säure	Gesamt-asche	Na Cl	P_2O_5	Ca O	D	D : N	$N : P_2O_5$	N : Gesamt-asche	Körper-gewicht	Temperatur
5. bis 6.	5,353	—	1,6972	0,735	0,664	0,0175	—	—	8,06	3,15	17 630 17 350	38,2° 38,1
6. „ 7.	3,394	—	0,8190	0,168	0,588	0,0198	—	—	5,77	4,13	17 170	38,1
7. „ 8.	3,864	0,1310	1,4502	0,168	0,639	0,0246	—	—	6,04	2,66	16 880	38,0
8. „ 9.	4,208	—	2,245	0,252	0,726	0,0366	—	—	5,79	1,90	16 530	38,1
Operation 18. Juli 1907 6p. Körpergewicht 16 440 g.												
18. 8p bis 19. 10a, 14 Std.	6,700	—	7,2837	1,837	1,644	0,0124	15,763	2,35	4,07	0,92	15 680	38,1 38,0
19. bis 20., 24 Std. . . .	11,834	—	5,6762	0,747	1,275	0,1522	38,039	3,14	9,20	2,09	14 890	38,0 38,6
20. „ 21., 24 „ . . .	11,981	0,252	6,3587	1,805	1,672	0,0792	34,540	2,88	7,16	1,88	—	38,0 38,0
21. „ 22., 24 „ . . .	12,012	0,2709	6,957	1,410	2,100	0,0885	38,250	3,18	5,72	1,72	14 080	37,7 38,0

CaO: Die Steigerung beträgt in den drei letzten Tagen der Periode das 3,9 fache.

P_2O_5: Verhält sich ebenso wie die N-Ausscheidung. Der Quotient $N:P_2O_5$ bleibt im Mittel derselbe wie in der Hungervorperiode.

Harnsäure: Steigerung um das Doppelte.

Gesamtasche: Die erste 14 stündige Periode fällt wegen Eingießung der Kochsalzlösung aus. Von nun an sehr schöne Einstellung. Steigerung um das 4,1 fache. Sie ist also größer als die Erhöhung des Eiweißumsatzes. Dementsprechend liegen alle Werte des Quotienten N : Gesamtasche tiefer, als die entsprechenden Werte der Vorperiode. Gegen Ende nähern sich die Werte beider Perioden einander.

Körpergewichtsabnahme: Im Mittel pro Tag 670 g; etwa 2,5 mal größer als in der Vorperiode.

Körpertemperatur: Nur am 20. Juli morgens leichte Steigerung der Temperatur. Kleiner, ganz oberflächlicher Nahtabszeß. Nach dessen Eröffnung sofort Absinken der Temperatur zur Norm.

Ergebnisse.

1. Bei normalen Hunden tritt in den ersten Hungertagen eine Abnahme der Stickstoffausscheidung und fast aller Mineralbestandteile ein, worauf am dritten und vierten Tage meistens eine allmähliche geringe Wiedererhebung der betreffenden Werte folgt. Die Gesamt-Aschenausscheidung durch den Harn läßt diese Senkung und den nachfolgenden geringen Anstieg deutlicher erkennen als der Stickstoff. Das Verhältnis N : Gesamtasche fällt daher deutlich ab. Auf die Ursache des Wiederanstieges der Eiweißzersetzung wollen wir hier nicht eingehen, da diese vielumstrittene Frage durch unsere kurzdauernden Versuche nicht weiter gefördert wird. Das Verhalten des Quotienten N : Gesamtasche könnte so gedeutet werden, daß zuerst das salzärmere Reserveeiweiß verbrennt, während später salzreicheres organisiertes Eiweiß einschmilzt. Vielleicht nimmt auch die Atrophie des Knochengewebes mit dem Schwunde leicht zersetzlichen Materials zu. Für diese Annahme könnte man den Anstieg der Calciumausscheidung heranziehen.

2. Nach der Exstirpation des Pankreas tritt regelmäßig eine enorme Steigerung der Eiweißzersetzung ein, die hier sicherlich durch infektiöse Prozesse nicht hervorgerufen oder beeinflußt ist. Die Verhältnisse liegen hier klarer als bei der Phlorizinglykosurie, wo sich bei maximaler Vergiftung kaum Steigerungen der Temperatur vermeiden lassen, die als Phlorizinwirkung aufgefaßt werden müssen; denn sie treten auch bei Verwendung alkoholischer Lösungen auf, wo von einer Infektion keine Rede sein kann.

3. Mit der Steigerung der Eiweißzersetzung geht eine Vermehrung in der Ausfuhr sämtlicher (untersuchter) Mineralbestandteile des Harns einher. Die Steigerung der Gesamt-Aschenausscheidung ist dabei größer als die der Stickstoffausfuhr. In einem anderen Versuch (Versuchsprotokoll III) mit völlig fieberfreiem Verlauf war die Stickstoffausscheidung um das 4,6 fache, die Gesamt-Aschenausscheidung um das 5,6 fache gesteigert. Die Werte für den Quotienten N : Gesamtasche liegen demnach sämtlich tiefer als die der betreffenden Tage der Vorperiode. Da bei pankreasdiabetischen Hunden sich nur eine geringe Azidose zu entwickeln pflegt[1]), so dürfte dieser ausgiebige Verlust an Mineralbestandteilen wohl darauf beruhen, daß das salzarme Reserveeiweiß rascher aufgebraucht ist, und es so noch viel rascher als im bloßen Hunger und viel ausgiebiger zur Einschmelzung salzreichen Organeiweißes und zur Atrophie des Knochengewebes kommt.

4. Nach der Pankreasexstirpation findet sich auch die endogene Harnsäureausscheidung vermehrt.

5. An der gesteigerten Ausfuhr der Stoffwechselschlacken beteiligt sich der Darm nur in untergeordnetem Maße. In einem Versuche (Versuchsprotokoll III) wurde auch in dem genau abgegrenzten Kote der betreffenden Perioden Stickstoff und Gesamtasche bestimmt. Der Hund war 10 kg schwer. Es fanden sich in der Hungerperiode pro die 0,10 g N und 0,2697 g Asche; in der Periode nach der Pankreasexstirpation pro die 0,36 g N und 0,3591 g Asche.

Überblicken wir die angeführten Versuche, so lassen dieselben kaum den Schluß zu, daß sich nach der Exstirpation des Pankreas gewisse Gewebe in besonderer Weise an dem Zerfall beteiligen. Wir finden vielmehr einen Hungerstoffwechsel, der genau die Verhältnisse vor der Exstirpation des Pankreas, allerdings um das 3,5 bis 4,5 fache vergrößert, wiedergibt.

---

[1]) Auch bei den von uns untersuchten Hunden wichen die durch Titration und Polarisation erhaltenen Zuckerwerte höchstens um 0,1 g voneinander ab.

Beiträge zur Chemischen Physiologie und Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

XI. Band 7. bis 9. Heft

(Ausgegeben April 1908)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1908

Inhalt des 7. bis 9. Heftes.

XVI.

Zur Kenntnis der Eiweißpeptone.

(Dritte Mitteilung.)

Von Dr. **F. Rogozinski** (Krakau).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

---

1. Das Arginin-Histidin-Pepton aus Bluteiweiß.

Um die von Raper[1]) begonnene Bearbeitung der Pepsinpeptone aus der Jodquecksilberkaliumfraktion der Bluteiweißverdauung weiterzuführen, habe ich die von Raper dargestellte, mir von Herrn Prof. Hofmeister freundlichst überlassene Phenylisocyanatverbindung Ab (nach Rapers Bezeichnung) näherer Untersuchung unterzogen.

Diese Verbindung war von Raper erhalten worden als der aus heißem Alkohol beim Erkalten ausfallende Teil des Niederschlags, der in der alkalischen Lösung der Peptonphenylisocyanatfraktion A durch Sättigung mit Kohlensäure entstand. Die durch oftmaliges Umfällen gereinigte Substanz, welche aus Alkohol als weißes, nicht doppelbrechendes Pulver ausfiel, schmolz nach dem Trocknen konstant bei 178 bis 180° unter Zersetzung. Nach den Bestimmungen von Raper enthielt sie: 55,59 Proz. C, 6,77 Proz. H und 16,46 Proz. N. Ihr Molekulargewicht ergab sich, nach dem Neutralisationsvermögen berechnet, zu 713 bzw. einem Vielfachen davon. Die Zahl der eingetretenen Phenylcarbaminsäuregruppen wurde auf Grund der von Raper dargestellten Bromphenylisocyanatverbindung zu drei bestimmt. Unter Zugrundelegung der Analysenergebnisse berechnete Raper für die Phenylisocyanatverbindung die Formel $C_{32}H_{46}N_8O_9$, für die Bromphenylisocyanatverbindung $C_{64}H_{89}Br_3N_{16}O_{18}$, woraus sich bei Annahme des Eintritts von drei

---

[1]) Diese Beiträge 9, 168.

Phenylisocyanatgruppen für das zugrunde liegende Polypeptid die einfachste Formel $C_{43}H_{77}N_{13}O_{15}$ ableitet. Die Substanz für sich gab nur Biuret- und Xanthoproteïnsäurereaktion. Die Reaktionen nach Millon, Molisch und Adamkiewicz waren negativ.

Das von mir untersuchte Präparat löste sich in $^1/_5$ n-Kalilauge leicht zu einer klaren, gelblichen Flüssigkeit auf. Auf Zusatz von Baryumacetatlösung bildete sich ein gelatinöser Niederschlag. Die Substanz zeigte bei den allgemeinen Eiweißreaktionen das von Raper angegebene Verhalten. Um die Vorprüfung in dieser Richtung zu ergänzen, wurde eine kleine Menge (0,05 g) 6 Stunden lang mit konzentrierter Salzsäure am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung färbte sich anfänglich violett, dann wurde sie braun. Die hydrolysierte Flüssigkeit, welche keine Biuretreaktion mehr zeigte, gab deutliche Rotfärbung mit Millons Reagens. Es scheint somit in der Phenylisocyanatverbindung die Tyrosin- bzw. eine Oxyphenylgruppe in einer Weise gekoppelt zu sein, welche ihr Reaktionsvermögen aufhebt. Die Reaktionen von Molisch und Adamkiewicz[1]) waren auch in der hydrolysierten Flüssigkeit negativ.

2. Stickstoffverteilung.

Um näheren Aufschluß über die quantitativen Verhältnisse der vorhandenen stickstoffhaltigen Gruppen zu gewinnen, habe ich in der vorliegenden Substanz die Stickstoffverteilung nach den von Hausmann[2]) angegebenen, von Gümbel[3]) und Rothera[4]) vervollständigten Methoden untersucht.

Zu diesem Zwecke wurden 0,4578 g Substanz mit 20 ccm Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 10 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht, die Salzsäure im Vakuum bei 45° soweit als möglich abdestilliert, der Rückstand im Wasser gelöst, wobei von der minimalen entstandenen Trübung abfiltriert wurde, das Filtrat mit Schwefelsäure versetzt, bis der Gehalt daran 5 Proz. betrug, und auf 100 ccm gebracht. 25 ccm davon wurden mit Phosphorwolframsäure im geringen Überschuß ausgefällt, der Niederschlag mit schwefelsäure- und phosphorwolframsäurehaltigem Wasser gut ausgewaschen, in starkem Alkali gelöst, die Lösung auf 100 ccm gebracht. Ebenso wurde das Filtrat mit der Waschflüssigkeit zusammen auf 100 ccm gebracht. In aliquoten Teilen sowohl der einen wie der anderen Lösung wurde der Stickstoff bestimmt und auf die Gesamtmenge berechnet. In 40 ccm der schwefel-

[1]) Die Tryptophanreaktion wurde, wie auch in allen übrigen Fällen, sowohl nach dem Verfahren von Adamkiewicz mit Eisessig, wie nach dem von Hopkins mit Glyoxylsäure ausgeführt.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 95 u. 29, 136.

[3]) Diese Beiträge 5, 297.

[4]) Ebenda 5, 442.

sauren Lösung wurde das Ammoniak bestimmt: die Lösung im Becherglas mit frisch ausgeglühter Magnesia neutralisiert, in einem Kolben mit Magnesia vermengt, welche 1 Stunde lang mit Wasser ausgekocht worden war, und der Destillation unter gewöhnlichem Druck unterworfen. Im Destillat wurde das abgespaltene Ammoniak durch Titration bestimmt. Bei der Destillation mit Magnesia wurde auch das Anilin, welches, wie Raper gezeigt hat, bei der Hydrolyse aus den Phenylcarbaminsäuregruppen entsteht, als nicht titrierbare Base übergetrieben. Um seine Menge zu ermitteln, wurde das Destillat auf ein bestimmtes Volumen gebracht, aliquote Teile davon mit Schwefelsäure angesäuert, eingeengt, schließlich nach Kjeldahl verbrannt, und der Gesamtstickstoff des Destillats bestimmt. Nach Abzug des bei Magnesiadestillation erhaltenen Ammoniakstickstoffs ergab sich die Menge des Anilinstickstoffs.

Es wurden in den verschiedenen Fraktionen, auf die gesamte Substanz berechnet, folgende Stickstoffmengen erhalten:

1. Im Phosphorwolframsäureniederschlag	0,0381 g	N =	8,32 Proz.
2. Im Filtrat	0,0392 g	„ =	8,56 „
3. Als Ammoniak	0,0032 g	„ =	0,69 „

Von dem gesamten in 1. und 2. gefundenen Stickstoff entfallen somit: auf den Amid- und Diaminostickstoff 49,28 Proz., auf den Anilin- und Monaminostickstoff 50,72 Proz.

Die Verteilung des Stickstoffs in der vorliegenden Substanz ist somit:

Gefunden:		Berechnet auf 16 Atome N = 100:	
Ammoniak-N	4,08 Proz.	für 1 N	6,25 Proz.
Anilin-N	18,57 „	„ 3 N	18,75 „
Diamino-N	45,20 „	„ 7 N	43,75 „
Monamino-N	32,16 „	„ 5 N	31,25 „

Die analysierte Substanz enthielt nach meinen Bestimmungen:

15,53
15,84 } im Mittel 15,65 Proz. N,
15,58

somit in 0,4578 g 0,0717 g N. Statt dessen ergibt die Summe von 1. und 2. 0,0773 g N, was mit der Erfahrung im Einklang steht, daß die Methode meist ein Plus an Stickstoff ergibt. Die Menge des Anilinstickstoffs entspricht genau der von der Raperschen Formel verlangten Zahl der Phenylcarbaminsäuregruppen.

Bei Vergleich der gewonnenen Zahlen mit jenen, welche Raper für die von ihm untersuchte Phenylisocyanatverbindung Ac ermittelt hat, ergeben sich zwischen beiden auffällige Unterschiede.

Raper findet nachstehende Stickstoffverteilung für das Ac-Phenylisocyanat:

Gefunden:		Berechnet auf 16 Atome N = 100:	
Ammoniak-N	11,5 Proz.	für 2 N	12,5 Proz.
Anilin-N	26,4 „	„ 4 N	25,0 „
Diamino-N	25,8 „	„ 4 N	25,0 „
Monamino-N	35,9 „	„ 6 N	37,5 „

Während die aus der Analyse sich ergebenden Bruttoformeln für die Ab- und Ac-Verbindung Rapers ($C_{32}H_{46}N_8O_9$ und $C_{34}H_{48}N_8O_9$) nur auf eine sehr geringe Verschiedenheit der zugrunde liegenden Polypeptide hinzudeuten scheinen, weist schon die von Raper ermittelte Tatsache, daß das Ab-Pepton drei, das Ac-Pepton vier Phenylisocyanatgruppen aufnimmt, auf eine tiefer greifende Differenz, und das obige Ergebnis der Stickstoffverteilung läßt keinen Zweifel, daß es sich um zwei ganz verschiedene Polypeptide handelt. Einerseits enthält die von mir untersuchte Ab-Verbindung höchstens 1 Atom N (von 16) als NH_3, die Ac-Verbindung dagegen 2 Atome. Andererseits ist der Gehalt an Diamino-N in Ab (45,20 Proz.) viel höher als in Ac (25,80 Proz.). Das Verhältnis des Diamino- zu Monaminostickstoff, welches bei Raper 0,72 beträgt, ist bei mir doppelt so hoch, 1,41. Dieser Umstand ließ a priori vermuten, daß in der von mir untersuchten Substanz N-reichere Basen (Arginin oder Histidin) vertreten sein müssen, im Gegensatz zu der Verbindung von Raper, welche bloß Lysin enthält.

3. Hydrolyse der Ab-Phenylisocyanatverbindung.

Um die Anwendung der Salzsäure, welche bei weiterer Verarbeitung lästig ist, zu vermeiden, wollte ich ursprünglich die Spaltung mit Schwefelsäure ausführen. Bei einem Vorversuch mit geringer Substanzmenge stellte sich jedoch heraus, daß selbst nach 20 Stunden fortgesetztem Kochen mit 15 proz. Schwefelsäure ein ungelöster Rückstand blieb. Dieses Ergebnis, welches an der Hand späterer Erfahrungen leicht verständlich wurde, bezog ich zunächst auf unvollständige Spaltung und zog es daher vor, die Spaltung mit Salzsäure auszuführen.

6 g Substanz — die ganze Menge, die mir zur Verfügung stand — wurden mit 120 ccm Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 10 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Die Flüssigkeit wurde vorübergehend violett, dann braun, blieb aber klar und lieferte nur eine minimale Menge melaninartigen Rückstandes. Sie wurde behufs Entfernung der Salzsäure im Vakuum bei 40° destilliert, bis der Rückstand beim Erkalten erstarrte. Dieser

wurde mit kaltem Wasser aufgenommen, wobei ein Teil in Form einer dunkelbraunen, harzigen Masse ungelöst blieb.

Dieser Rückstand, der auch in 5 proz. Schwefelsäure unlöslich war, bestand der Hauptmasse nach aus einer gut kristallisierenden, stickstofffreien, bei 99 bis 101° schmelzenden Säure.

Er löste sich fast klar in kochendem Wasser und fiel beim Erkalten aus, löste sich in Natronlauge zu einer gelblichen Lösung, aus welcher er durch Essigsäure flockig gefällt wurde, und war äußerst leicht löslich in Alkohol. Zur Reinigung wurde die Substanz in wenig absolutem Alkohol gelöst und die Lösung der freiwilligen Verdunstung überlassen. Es schieden sich kristallinische Massen aus, neben welchen jedoch eine Beimengung in Form von dunkelbraunem Öl vorhanden war. Die weitere Trennung wurde durch Benzolbehandlung erzielt: die Substanz wurde in Benzol gelöst, von dem geringen harzig-öligen Rückstand abfiltriert; nach dem Verdunsten des Benzols schied sie sich in Form von gelblichen Tropfen aus, die zu wachsartigen Massen erstarrten. Um sie besser kristallisiert zu erhalten, wurde sie noch zweimal aus absolutem Alkohol umkristallisiert. Schließlich wurde die Substanz in Form von rein weißen, seidenglänzenden, strahlig angeordneten Nadeln erhalten.

Die Kristalle waren weich, erinnerten in ihrer Beschaffenheit an höhere Fettsäuren. Der Schmelzpunkt, der bei dem Rohprodukt 78° war, stieg nach der Reinigung auf 98° und nach nochmaligem Umkristallisieren aus petrolätherhaltigem Benzol auf 99 bis 101°.

Die mit allen Kautelen nach der von Hofmeister[1]) angegebenen Modifikation der Lassaigneschen Probe ausgeführte Prüfung auf Stickstoff gab ein negatives Resultat.

Auf dem Platinblech erhitzt, schmilzt die Substanz leicht und verbrennt unter Entwickelung eines wachsartigen Geruches ohne Rückstand.

Die reine Substanz löst sich in Kalilauge klar, wird durch Essigsäure gefällt, die Fällung wird von Äther klar gelöst. Durch Eintragen von Kochsalz läßt sie sich aus der alkalischen Lösung aussalzen.

Die alkalische Lösung gibt mit Calciumchloridlösung einen feinflockigen Niederschlag. Die Substanz ist leicht löslich in Benzol und Äther, sehr leicht löslich in Alkohol. Aus der Benzol-, aber nicht aus der Alkohollösung ist sie mit Petroläther fällbar.

Das ganze Verhalten erinnert an jenes hoher Fettsäuren, namentlich der Oxyfettsäuren. Im Schmelzpunkt und manchen anderen Eigenschaften besteht eine auffallende Ähnlichkeit mit der bei Spaltung des Cerebrons

---

[1]) Leitfaden für den praktisch-chemischen Unterricht der Mediziner. 2. Aufl., 1906, S. 42.

erhältlichen Cerebronsäure[1]). Andererseits ist eine Beziehung zu der von Raper bei der Hydrolyse der Ac-Phenylisocyanatverbindung erhaltenen ätherlöslichen Säure, F.-P. 110 bis 111°, nicht ausgeschlossen.

Der Nachweis, daß bei der Spaltung der Eiweißderivate bzw. Eiweißkörper Fettsäuren auftreten, wäre sowohl in chemischer als in physiologischer Hinsicht von größter Wichtigkeit. Daß es sich um eine dem verdauten Serumeiweiß anhaftende Beimengung handelt, die bei den zahlreichen Trennungs- und Reinigungsprozeduren (Salz- und Metallfraktionierung, Darstellung und Reinigung des Phenylisocyanats) gerade in diese konstant schmelzende Fraktion geraten wäre, ist durchaus unwahrscheinlich. Doch möchte ich angesichts der geringen Ausbeute mit den sich aufdrängenden Vermutungen zurückhalten, bis eine Bestätigung des Befundes und die Analyse der Substanz vorliegt.

Ich hoffe durch weitere Untersuchungen, die ich mir vorbehalte, etwas mehr Licht in diese Frage bringen zu können.

Die nach Abtrennung der geschilderten Substanz erhaltene wässerige Lösung der übrigen Spaltungsprodukte enthielt noch Salzsäure. Um sie davon zu befreien, wurde fein gepulvertes Silbersulfat eingetragen, bis das ganze Chlor gebunden war. Der abfiltrierte Chlorsilberniederschlag wurde mit Wasser ausgekocht, das Waschwasser mit dem Filtrat vereinigt und die gesamte Flüssigkeit mit Schwefelwasserstoff von Silber befreit. Nach Entfernung des überschüssigen Schwefelwasserstoffs wurde die Flüssigkeit unter Zusatz von Schwefelsäure mit Wasser auf 600 ccm gebracht, so daß der Gehalt an Säure 5 Proz. betrug, und mit überschüssiger Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag gut ausgewaschen und scharf abgesaugt.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde durch Zerreiben mit kristallisiertem Barythydrat und Auskochen mit Barytwasser, welche Behandlung dreimal wiederholt wurde, zerlegt, die gesamte Flüssigkeit vereinigt, durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit, aufgekocht, filtriert und auf dem Wasserbade eingeengt. Nachdem die Flüssigkeit auf etwa 20 ccm gebracht war, schied sie beim Erkalten einen fein kristallinischen Niederschlag aus, der abfiltriert wurde. Die Menge des Rohproduktes betrug nur etwa 0,08 g. Die Substanz wurde aus 70 proz. Alkohol umkristallisiert, mit absolutem Alkohol, worin sie unlöslich war, ausgewaschen. Nach zweimaligem Umkristallisieren wurde

[1]) Thierfelder, Zeitschr. f. physiol. Chemie 43, 21—31.

der Schmelzpunkt zu 231 bis 233° gefunden; beim Schmelzen trat Gasentwickelung ein. Auf dem Platinblech erhitzt, entwickelte die Substanz deutlichen Geruch nach Phenylisocyanat und Anilin, beim Erhitzen mit festem Kali und Zinkstaub einen Geruch nach Anilin. Sie gab weder Biuretreaktion, noch die Reaktionen nach Millon, Molisch und Adamkiewicz. In kaltem Wasser war sie wenig, im kochenden besser, in Säuren und Alkalien leicht löslich; in absolutem Alkohol unlöslich, in heißem 70 proz. Alkohol dagegen ziemlich leicht löslich. Sowohl die Darstellungsweise wie auch das ganze Verhalten und der Schmelzpunkt sprechen für ihre Identität mit der von Raper beschriebenen „schwerlöslichen Base“ (F.-P. 231 bis 233°). Die von mir erhaltene Menge an gereinigter Substanz (etwa 0,07 g) reichte kaum für eine N-Bestimmung.

0,0564 g bei 100° getrockneter Substanz gaben:
8,81 ccm N bei 19,8° und 756,4 mm Hg = 17,84 Proz. N.

Dieses Ergebnis, mit den Analysenangaben von Raper zusammengestellt, führt zu der Zusammensetzung:

59,43 Proz. C; 7,18 Proz. H; 17,84 Proz. N.

Das Filtrat von der schwerlöslichen Base wurde nunmehr, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß es kein Lysin enthielt, mit Schwefelsäure angesäuert, bis der Gehalt daran 5 Proz. betrug, und mit mäßigem Überschuß des Hopkinsschen Histidinreagens versetzt. Es entstand dabei ein reichlicher Niederschlag.

Der Niederschlag wurde nach 24 stündigem Stehen abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Sein Gewicht im trockenen Zustande betrug 1,0064 g. Er wurde fein zerrieben, in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat nach Entfernung von Schwefelwasserstoff mit Barythydrat von der Schwefelsäure befreit, der Überschuß von Baryt durch Kohlensäureeinleiten und Aufkochen entfernt, die filtrierte Lösung auf ein kleines Volumen eingeengt.

Da sie noch Spuren von Baryt enthielt, wurde letzteres quantitativ mit Schwefelsäure entfernt, die Lösung mit konzentrierter Salzsäure schwach sauer gemacht, zum dünnen Sirup eingedampft und der Kristallisation überlassen.

Es wurden schließlich einige langgestreckte, dünne Prismen erhalten, die Histidindichlorid sein konnten; ihre Menge war jedoch für eine weitere Untersuchung zu gering. Ich mußte mich daher mit dem qualitativen Nachweis von Histidin begnügen: die Lösung (sie war tyrosinfrei) gab eine sehr starke Imidazolreaktion

(nach Pauly[1]) und die für Histidin charakteristische Herzogsche Reaktion — deutliche Biuretfärbung beim Erhitzen mit Natronlauge und einer Spur Kupfersulfat.

Das Filtrat vom Quecksilber-Histidinniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber, mit Barythydrat von Schwefelsäure und mit Kohlensäure von Baryt befreit und auf ein kleines Volumen gebracht. Da der wiederholte Versuch, in dieser Lösung Lysin mit alkoholischer Pikrinsäurelösung nachzuweisen, neuerlich ein negatives Resultat gab, wurde sie, nachdem sie mit Schwefelsäure quantitativ von Baryt befreit worden war, nach dem Vorgang von Gulewitsch[2]) auf Arginin verarbeitet.

Die Lösung wurde mit Salpetersäure schwach angesäuert, mit konzentrierter alkoholischer Lösung von Silbernitrat versetzt, zum Sirup eingeengt, wobei eine teilweise Reduktion des Silbers stattfand, die sirupöse Flüssigkeit in absolutem Alkohol gelöst und im Reagenzglas mit Äther überschichtet. Es entstand hierbei eine starke Trübung, die sich bald unter Klärung der Lösung als ölige Masse absetzte. Das Öl wurde bald kristallinisch. Die Kristalle wurden auf Ton von Mutterlauge befreit und im Vakuum getrocknet. Ihre Menge betrug 0,1 g. Die mit der offenbar noch nicht ganz reinen Substanz ausgeführte Bestimmung ergab 25,50 Proz. Ag. (Nach Gulewitsch beträgt der Silbergehalt des sauren Argininsilbernitrats 26,50 Proz. Ag.)

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit Barythydrat bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, der entstandene Niederschlag von Baryumsulfat und -Phosphorwolframat mit Wasser gewaschen und ausgekocht, die gesamte Lösung durch Kohlensäureeinleiten von Baryt befreit und auf ein kleines Volumen eingeengt. Sodann wurde die noch heiße Flüssigkeit behufs Fällung von glutaminsaurem und asparaginsaurem Baryum unter Umrühren in die fünffache Menge absoluten Alkohols eingegossen.

Es entstand eine starke milchig-weiße Trübung. Da sie sich auch nach 24 Stunden nicht absetzte, wurde die Flüssigkeit mit $^1/_4$ Volumen Äther versetzt; dabei wurde der Niederschlag flockig und filtrierbar. Der Niederschlag wurde in kaltem Wasser gelöst, wobei etwas Baryumkarbonat zurückblieb. Die Lösung wurde nochmals mit absolutem Alkohol gefällt, da jedoch der entstandene Niederschlag auch durch Ätherzusatz nicht zum Absetzen gebracht werden konnte, wurde die gesamte Lösung zur Trockne gebracht, im Wasser gelöst, das noch vorhandene Baryt quantitativ mit Kupfersulfatlösung entfernt und die Lösung mit Kupferkarbonat gekocht. Das tiefblaue

---

[1]) Über die Konstitution des Histidins. Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 508.

[2]) Über das Arginin. Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 178.

Filtrat wurde, um es von eventuellen Beimengungen zu trennen, mit 60 proz. Alkohol versetzt, wobei eine starke ölige Fällung entstand. (Eine Spur davon im Wasser gelöst, gab mit Silbernitrat bei vorsichtigem Zusatz von Ammoniak, und ebenso mit basischem Bleiacetat einen weißen, flockigen Niederschlag, welche Reaktionen die Gegenwart von Glutaminsäure wahrscheinlich machen.) Die gesamte Fällung wurde sodann von der Flüssigkeit getrennt, im Wasser gelöst (die Lösung war nunmehr viel heller und mit einem deutlichen grünlichen Stich), eingeengt und stehen gelassen. Nach 24 Stunden schieden sich die wetzsteinförmigen, sehr charakteristischen grünen Kristalle des glutaminsauren Kupfers aus. Am Rande der Schale, in der zuerst ausgeschiedenen Portion, waren himmelblaue Kristalle zu sehen, die sich schon der Farbe nach von dem Rest deutlich unterschieden; sie wurden daher von dem letzteren getrennt. Unter dem Mikroskop zeigten sie die für das asparaginsaure Kupfer charakteristischen Formen (Büschel von feinen Nadeln). Ihre Menge war äußerst gering. Das glutaminsaure Kupfer wurde abgesaugt, mit wenig Wasser, absolutem Alkohol und Äther gewaschen. Die Menge des lufttrockenen Materials betrug 0,1202 g. Die damit ausgeführte Kupferbestimmung ergab 25,19 Proz. Cu. [Nach Hofmeister[1]) enthält glutaminsaures Kupfer 25,08 Proz. Cu.]

Die Lösung der alkohollöslichen Substanzen wurde zur Trockne gebracht und wiederholt mit absolutem Alkohol ausgekocht, um das Prolin in Lösung zu bringen.

Die hierbei erhaltene stark gelbe alkoholische Lösung, welche beim Erkalten einen beträchtlichen Niederschlag von beigemengten Aminosäuren ausfallen ließ, wurde zur Trockne verdampft und der gelbe, teigige Rückstand mit kaltem, absolutem Alkohol wiederholt ausgezogen. Das Prolin ging dabei in Lösung und es blieb ein weißer Rückstand, der mit der Hauptmasse der in absolutem Alkohol unlöslichen Aminosäuren vereinigt wurde. Die Prolinlösung wurde zur Trockne gebracht, in Wasser gelöst und mit Kupferkarbonat gekocht. Die entstandene tiefblaue Lösung entwickelte beim Eindampfen sowie beim Erwärmen mit Alkali den charakteristischen Geruch und gab deutliche Fichtenspannreaktion. Sie wurde stark eingeengt und der Kristallisation überlassen. Da aber auch nach längerem Stehen keine Kristalle zur Ausscheidung kamen, wurde die Lösung mit Schwefelwasserstoff von Kupfer befreit, alkalisch gemacht und mit Phenylisocyanat behandelt. Es bildete sich hierbei ein mit Säure fällbares Kondensationsprodukt, seine Menge aber war so äußerst gering, daß die Überführung in das Anhydrid nach dem von Fischer[2]) angegebenen Verfahren als aussichtslos unterlassen wurde.

Der im absoluten Alkohol ungelöst gebliebene Rückstand wurde nunmehr mit 60 proz. Alkohol aufgenommen, um das darin unlösliche Tyrosin abzutrennen. Der größte Teil ging dabei in

---

[1]) Ann. d. Chem. 189, 6.

[2]) Über die Hydrolyse des Caseïns durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 151.

Lösung; der ungelöste Rückstand, aus heißem Wasser umkristallisiert, zeigte die für das Tyrosin so typische Kristallform und gab sehr starke Millonsche Reaktion.

Die Menge des in der Hauptkristallisation erhaltenen Tyrosins betrug 0,0178 g. Aus der Mutterlauge konnten noch weitere 0,0034 g, somit im ganzen 0,0212 g (bei 100° getrocknet) erhalten werden. Die nach Kjeldahls Methode ausgeführte N-Bestimmung ergab 8,39 Proz. N statt der berechneten 7,73 Proz. Die nur annähernde Übereinstimmung kann bei der geringen Menge des Materials nicht befremden.

Die nach Abtrennung des Tyrosins erhaltene Lösung der übrigen Aminosäuren in 60 proz. Alkohol wurde zur Trockne gebracht. (Der Rückstand gab die für Leucin charakteristische Sublimationsreaktion, wobei aber ein kleiner Rest zurückblieb.) Der Rückstand wurde in kaltem Wasser gelöst, wobei noch eine Spur Tyrosin ungelöst blieb, und die Lösung mit Kupferkarbonat gekocht. Das erste Aufkochen lieferte ein tiefblaues, das zweite Auskochen des Rückstandes dagegen ein hellblaues Filtrat. Die erstere Lösung wurde nunmehr zur Trockne gebracht und in der Kälte mit Methylalkohol behandelt. Ein Teil ging dabei in Lösung. Die tiefblaue methylalkoholische Lösung, in der Valin und Isoleucin zu vermuten waren, wurde eingeengt; es gelang aber nicht, die von Fischer[1]) beschriebenen Mischkristalle zu bekommen. Es muß somit unentschieden bleiben, welche von den beiden Aminosäuren vorhanden war; jedenfalls war wenigstens eine Aminosäure, obgleich in sehr geringer Menge, vertreten, die ein in Methylalkohol leicht lösliches Kupfersalz liefert.

Der nach Methylalkoholbehandlung zurückgebliebene Rückstand wurde im Wasser gelöst und eingeengt. Charakteristische Kristalle von Phenylalaninkupfer konnten daraus nicht erhalten werden; seine Anwesenheit wurde aber durch folgende Reaktionen wahrscheinlich gemacht: die angesäuerte konzentrierte Lösung gab eine starke Fällung mit Phosphorwolframsäure; bei Oxydation mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure gab die Lösung einen starken Geruch nach Phenylacetaldehyd.

Eine Ausscheidung von Alaninkupfer erfolgte nicht.

Endlich schied die hellblaue Lösung des schwer löslichen Kupfersalzes nach starkem Einengen und Erkalten Kristalle aus,

[1]) Über die Hydrolyse des Kaseïns durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 162.

die nach ihrer Schwerlöslichkeit, Farbe und mikroskopischen Form, wie auch der Sublimatbildung und dem Geruch beim Erhitzen, typisches Leucinkupfer darstellten.

4.

Im folgenden stelle ich die von mir gefundenen Spaltungsprodukte der Substanz Ab denjenigen gegenüber, welche Raper bei der Hydrolyse der Substanz Ac ermittelt hat:

Substanz Ab	Substanz Ac
Base F.-P. 231 bis 233°	Base F.-P. 231 bis 233°
Histidin	Lysin
Arginin	—
Glutaminsäure	Glutaminsäure
(Prolin[1])	Prolin
Asparaginsäure	—
Leucin	Leucin
Tyrosin	Tyrosin
(Phenylalanin)	—
(Valin oder Isoleucin)	—
Anilin	Anilin
Ammoniak	Ammoniak
N-freier Körper F.-P.: 99 bis 101°	Ätherlösl. Körper F.-P.: 110 bis 111°

Was an diesem Ergebnis am meisten überrascht, ist, neben der großen Zahl verschiedener Aminosäurengruppen, wie sie schon Raper aufgefallen ist, der tiefgreifende Unterschied in der Natur der basischen Komponenten der beiden in ihrer Zusammensetzung so nahestehenden Substanzen. Das Lysin, welches die Hauptmasse der basischen Spaltungsprodukte der Substanz Ac darstellt, konnte in Ab gar nicht gefunden werden, während Ab sicher Arginin und Histidin enthielt. Auf Grund dieses Unterschiedes empfiehlt es sich, das Pepton, das im Phenylisocyanat Ab, F.-P. 178 bis 180°, enthalten ist, vorläufig als Arginin-Histidinpepton, das Pepton des Phenylisocyanats Ac, F.-P. 169 bis 170°, als Lysinpepton zu bezeichnen.

Da das von Raper verwendete Blutalbumin ein Gemenge von Serumalbumin und Serumglobulin zu annähernd gleichen

[1]) Ich führe die nur qualitativ charakterisierten Substanzen, deren Nachweis einer Bestätigung bedarf, in Klammern an.

Teilen darstellt, liegt die Möglichkeit vor, daß eines dieser Peptone aus dem Albumin, das andere aus dem Globulin entstanden sei. Aber es ist ebensogut möglich, daß beide Produkte aus bloß einem dieser Eiweißkörper oder aber auch aus beiden nebeneinander hervorgegangen seien. Darüber können nur Versuche mit reineren, am besten kristallisierten Eiweißkörpern entscheiden. Solche Versuche sind denn auch in der Tat bereits im hiesigen Laboratorium in Angriff genommen.

XVII.

Zur Kenntnis der Eiweißpeptone.

(Vierte Mitteilung.)

Von Dr. **F. Rogozinski** (Krakau).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

---

1. Zur Kenntnis der Trypsinpeptone aus Bluteiweiß.

Stookey[1]) und Raper[2]) haben bereits die Peptone der peptischen Verdauung nach der von Hofmeister angegebenen kombinierten Salz- und Schwermetall-Fällungsmethode bearbeitet; ich habe mir in der folgenden Arbeit als Ziel gesetzt, die bei der Trypsinverdauung entstehenden Peptone in ähnlicher Weise zu untersuchen. Da der Abbau der Eiweißkörper bei der Trypsinverdauung viel rascher fortschreitet als bei der Pepsineinwirkung, so war dabei ein Überwiegen von einfacher gebauten Peptonen zu erwarten. Von der Vorstellung ausgehend, daß diese einfacheren Produkte der Aussalzung und Ausfällung schwieriger zugänglich sein dürften, habe ich meine Untersuchung auf die letzte Fällungsfraktion, d. h. die in gesättigter Ammonsulfatlösung durch Jodquecksilberjodkalium fällbaren Peptone beschränkt, während die Untersuchung der übrigen Fraktionen einem späteren Zeitpunkte vorbehalten wurde.

Durch den Verlauf der Untersuchung ist allerdings zweifelhaft geworden, ob die obige Voraussetzung zutrifft. Die trotz großen Materialaufwandes (12 kg Eiweiß) erzielte sehr geringe Ausbeute aus der Jodquecksilberfraktion trägt schuld, daß die vorliegende Arbeit einen vorwiegend orientierenden Charakter angenommen hat.

Als Ausgangsmaterial habe ich, ebenso wie Raper, käufliches, trockenes, gepulvertes Blutalbumin benutzt; als Pankreaspräparat

---

[1]) Diese Beiträge 7, 590.
[2]) Ebenda 9, 168.

diente in den Hauptversuchen Pankreatinum purum absolutum der Fabrik Rhenania, Aachen.

In Vorversuchen habe ich durch 24stündige Selbstverdauung bereitete Pankreasauszüge verwendet, die in der Tat gute Wirksamkeit besaßen; in der angewandten Konzentration (Auszug aus 350 g frischer Pankreassubstanz auf 100 g Blutalbumin) brachten sie in Mettschen Röhrchen bei 40° in 24 Stunden 9 mm koaguliertes Pferdeserumeiweiß in Lösung.

Da aber bei der Autolyse des Pankreas zahlreiche, nicht vom Albumin abstammende Produkte entstehen, die möglicherweise geeignet sind, die Ergebnisse der eigentlichen Albuminverdauung zu verdunkeln, habe ich mich nach reineren Trypsinlösungen umgesehen. Die von Schwarzschild[1]) benutzte Methode der Trypsingewinnung durch Fällung mit Uranylacetat erwies sich für meine Zwecke weniger geeignet; einerseits weil das Trypsin nicht ganz in das erste Extrakt übergeht, andererseits aber weil die Wirksamkeit des Auszuges in unberechenbarer Weise von Fall zu Fall wechselt. Dies veranlaßte mich, für die Darstellung der Peptone im Großen das obengenannte käufliche Trypsinpräparat zu benutzen, das den Vorzug gleichmäßiger Wirksamkeit besitzt. Das Pankreatin Rhenania ist ein gelblichweißes Pulver, das mit Wasser eine opaleszente Lösung gibt, wobei ein ungelöster Bodensatz bleibt. Ein Teil des Fermentes bleibt im Bodensatz zurück; denn die Flüssigkeit besitzt nach der Filtration eine geringere Wirksamkeit als vor derselben: nach Filtration verdaute sie in Mettschen Röhrchen bei 40° in 24 Stunden im Mittel 5 mm, ohne Filtration — 7,5 mm Bluteiweiß. Eine 0,5 proz. Lösung von Pankreatin besaß die gleiche Wirksamkeit wie die von mir in den Vorversuchen benutzten Pankreasextrakte.

Da meine Untersuchung auf die durch Quecksilberjodidjodkalium fällbare Fraktion gerichtet sein sollte, war es wichtig, zu prüfen, ob das Pankreatin bei Selbstverdauung nicht selbst zu dieser Fraktion gehörige Produkte liefert. Um diese Frage zu entscheiden, ließ ich 1 g Pankreatin unter Toluol bei 40° 6 Tage lang stehen. Die anfangs vorhandene Biuretreaktion blieb bis zum Ende der Selbstverdauung bestehen; bei Sättigung mit Ammonsulfat fiel ein ziemlich reichlicher Niederschlag aus; das Filtrat gab einen geringen Niederschlag mit ammonsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung. Das Filtrat von demselben, von Eisen befreit, gab nach Ansäuern keine Trübung mit salzgesättigter Quecksilberjodidjodkaliumlösung. Es ist somit erwiesen, daß aus dem Pankreatin keine dieser Fraktion angehörigen Peptone entstehen.

Bei Darstellung von Pepton in größerem Maßstabe verfuhr ich wie folgt: 500 g Pankreatin wurden in 100 Liter Wasser gelöst und unter Toluol bei 40° 24 Stunden lang stehen gelassen. Zu dieser Lösung wurden 5 kg gepulvertes Serumalbumin zugesetzt und bei gleicher Temperatur unter häufigem Umrühren 6 Tage verdaut. Nach beendeter Verdauung wurde die Lösung erhitzt, um das unveränderte Albumin auszukoagulieren. Die Filtrate

---

[1]) Diese Beiträge 4, 155.

wurden auf dem Wasserbade (bei dem zweiten Versuche im Vakuum bei 45°) auf etwa ein Zehntel des ursprünglichen Volumens eingeengt. Beim Erkalten fiel ein beträchtlicher körniger Niederschlag aus, aus welchem Tyrosin in großer Menge dargestellt werden konnte. Die von dem Niederschlag abgesaugte, dunkel gefärbte Flüssigkeit wurde bei Zimmertemperatur mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt, der aus ausgesalzenen Albumosen bestehende Niederschlag abfiltriert und scharf abgesaugt; das Filtrat gab mit salzgesättigter Zinksulfatlösung gar keine, mit salzgesättigter Kupfersulfatlösung eine ganz minimale Trübung; es wurde daher unmittelbar mit ammonsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung so lange versetzt, als sich ein Niederschlag bildete.

Das Filtrat von der Eisenammoniakalaunfällung wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff unter Zugabe von Ammoniak von Eisen befreit, neuerdings mit Ammonsulfat gesättigt, mit ammonsulfatgesättigter 10 proz. Schwefelsäure schwach sauer gemacht und mit ebenso angesäuerter, nach Rapers[1]) Vorschrift bereiteter Lösung von Quecksilberjodidjodkalium vollständig ausgefällt. Dabei entstand eine starke, milchige Trübung; der zunächst ausfallende Teil war ziemlich zähe, der übrige viel dünnflüssiger. Das Absetzen des Niederschlages bis zur vollständigen Klärung der überstehenden Flüssigkeit nahm zweimal 24 Stunden in Anspruch. Nach dieser Zeit lagerte die Hauptmasse des Niederschlages als gelbe, dickflüssige Masse am Boden des Gefäßes, der Rest haftete in Form von Tropfen am Glasstabe und an den Seitenwänden. Die gesamte Ausbeute war im Vergleich mit der bei Pepsinverdauung in der gleichen Fraktion zu erhaltenden außerordentlich gering.

Der gesamte Niederschlag wurde behufs Reinigung in 10 proz. Jodkaliumlösung gelöst. Im Gegensatze zu der gleichen Fraktion der Pepsinverdauung, die darin total löslich zu sein pflegt, blieb ein Teil in Form eines weißlichen, flockigen Niederschlages ungelöst zurück. Dieser Teil wurde abgesaugt und weiter für sich behandelt. Aus der Jodkaliumlösung wurde nunmehr die Peptonverbindung durch Eintragen von feingepulvertem Ammonsulfat zur Abscheidung gebracht. (Der Versuch, die Jodkaliumlösung mit Ammonsulfat fraktioniert zu fällen, hatte keinen Erfolg.) Die ausgeschiedene Verbindung wurde mit kleinen, wiederholt erneuerten Portionen destillierten Wassers sehr anhaltend durchgeknetet,

---

[1]) A. a. O., S. 169.

solange noch etwas in Lösung ging. Im ganzen kamen etwa 1500 ccm Wasser zur Verwendung. Es lösten sich bei dieser Behandlung etwa zwei Drittel des Niederschlages. Die ursprünglich flüssige Masse wurde dabei immer zäher und nahm schließlich Teigkonsistenz an. Sie wurde nunmehr auf die gleiche Weise mit 5 proz. Ammoniumkarbonatlösung bis zur vollständigen Erschöpfung behandelt. Der dabei verbleibende, ziemlich beträchtliche, noch härtere Rückstand, dem Raper in seinen Versuchen mit Pepsinverdauung gar nicht begegnet ist, löste sich nicht, wie es bei Stookey der Fall war, in 15 proz. Ammoniumkarbonatlösung, ebensowenig in 10 proz. Ammoniak. Erst durch anhaltendes Schütteln mit 20 proz. Ammoniak ging er unter reichlicher Abscheidung von Quecksilberjodid in Lösung.

Bei der Trypsinverdauung lassen sich somit in dem Quecksilberjodidjodkaliumniederschlag mehr Fraktionen unterscheiden als bei Pepsinverdauung:

1. Der in 10 proz. Kaliumjodidlösung unlösliche Teil des ursprünglichen Niederschlages;
2. der wasserlösliche Teil des Niederschlages (entsprechend der Fraktion B bei Raper);
3. der in 5 proz. Ammoniumkarbonatlösung lösliche Teil (entsprechend der Fraktion A bei Raper);
4. der in 20 proz. Ammoniak lösliche Teil.

2.

1. Der in 10 proz. Kaliumjodidlösung unlösliche Teil.

Die Substanz wurde nach dem Absaugen einmal mit 10 proz. Kaliumjodidlösung und dann dreimal mit Wasser fein zerrieben, nach jeder Behandlung scharf abgesaugt, das zum Schluß erhaltene schmutzig-grüne Pulver mit Schwefelwasserstoff zerlegt, aus dem Filtrat, welches frei von Ammoniak und Schwefelsäure war, das Jod mit Bleiacetat beseitigt, dann das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt. Die Lösung, bei 40° eingeengt, gab starke Biuretreaktion und wurde in der von Raper beschriebenen Weise mit Phenylisocyanat behandelt [1]). Beim Ansäuern fiel das Kondensationsprodukt flockig aus; nach dem Trocknen bildete es eine

[1]) Bei den Kondensationen habe ich ausschließlich Phenylisocyanat benutzt, da es nach Rapers Erfahrungen am leichtesten gut charakterisierte Produkte liefert. Vorversuche, die ich mit Benzoylchlorid, Benzolsulfochlorid, Naphtalinsulfochlorid und auch mit dem neuerdings von Neuberg und Manasse (Die Isolierung der Aminosäuren. Ber. d. d. chem. Ges. 38, II, 2359) empfohlenen α-Naphtylisocyanat ausgeführt habe, haben gezeigt, daß diese Kondensationsmittel in dem vorliegenden Falle dem Phenylisocyanat gegenüber keine besonderen Vorteile bieten.

dunkelbraune, harzige Masse. Ein Teil blieb in der Flüssigkeit gelöst und konnte daraus durch Eintragen von Kochsalz in Substanz bis zur Sättigung abgeschieden werden. Nach Erschöpfung mit Äther schmolz die Substanz unter Gasentwickelung unscharf bei 120 bis 140°. In Wasser, auch kochendem, war sie ziemlich schwer löslich und fiel beim Erkalten aus. In Alkali war sie leicht löslich und aus dieser Lösung mit Essigsäure fällbar. In absolutem Alkohol und Aceton löste sie sich auch beim Kochen nicht, dagegen in wasserhaltigem, heißem Alkohol und Aceton, und fiel aus der ersteren Lösung beim Erkalten ölig aus. Sie gab starke Xanthoproteïnsäurereaktion, schwache Biuret- und Millon-Reaktion, keine Reaktionen nach Molisch und Adamkiewicz.

2. Fraktion B[1]).

Die wässerige Lösung wurde mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber, mit Baryt von Schwefelsäure und durch anhaltendes Luftdurchleiten von Ammoniak, schließlich mit Bleiacetat von Jod befreit. Da die erhaltene Lösung noch immer Ammoniak enthielt, wurde sie mit etwas mehr als der nötigen Menge Natronlauge versetzt und bei 40° so lange destilliert, bis kein Ammoniak mehr überging. Sodann wurde die mit Essigsäure neutral gemachte Lösung bei der gleichen Temperatur stark eingeengt, schwach alkalisch gemacht und in der üblichen Weise mit Phenylisocyanat behandelt.

Die Arbeit wurde sehr erschwert durch das starke Schäumen der Flüssigkeit: beim Schütteln wandelte sich die ganze Lösung in eine dicke Schaummasse um, die sich auch bei stundenlangem Stehen nicht absetzte. Diese Erscheinung war, wie die mikroskopische Betrachtung lehrte, durch teilweises Aussalzen des gebildeten Produktes schon bei alkalischer Reaktion bedingt. Andererseits gestattete die ziemlich beträchtliche Löslichkeit des Produktes in Wasser keine Verdünnung. Teilweise konnte ich diesem Übelstande dadurch steuern, daß ich die Behandlung mit Phenylisocyanat wiederholt ausführte, wobei nach jeder Behandlung die Lösung mit Essigsäure gefällt, das ausgeschiedene Produkt abgesaugt, das Filtrat im Vakuum eingeengt, alkalisch gemacht und wieder mit Phenylisocyanat behandelt wurde. Das Kondensationsprodukt fiel in Flocken aus, die bald nach der Abscheidung starr und harzig wurden. Sie wurden abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen.

Die weitere Verarbeitung des Rohproduktes gestaltete sich folgendermaßen: Da, wie Vorversuche gelehrt hatten, die von Raper benutzte Methode der Kohlensäurefällung der alkalischen Lösung in meinem Falle nicht zum Ziele führte, benutzte ich zur Trennung die Fällung mit Baryumacetat.

---

[1]) Der Übersichtlichkeit wegen behalte ich die von Raper eingeführten Bezeichnungen bei.

Das Rohprodukt, das im Vakuum äußerst schwierig zu trocknen war, wurde direkt in kohlensäurefreier Kalilauge gelöst und mit einem mäßigen Überschuß einer 10proz. Lösung von Baryumacetat versetzt. Es fiel ein rein weißer, flockiger Niederschlag aus, der abgesaugt und mit kaltem Wasser, worin er unlöslich war, gewaschen wurde. Es konnte somit das Kondensationsprodukt in zwei, der Löslichkeit ihrer Barytsalze nach verschiedene Teile zerlegt werden. Das unlösliche Barytsalz wurde sodann mit Äther extrahiert, wobei wenig Diphenylharnstoff überging, dann mit Essigsäure zerlegt, die freie Säure in Alkali gelöst, nochmals mit Baryumacetat gefällt, das Barytsalz mit Essigsäure zerlegt und die Substanz mit Wasser ausgewaschen.

Die auf diese Weise gereinigte Substanz stellte ein wenig gefärbtes Pulver dar und schmolz vakuumtrocken scharf bei 167 bis 169°.

Von der genannten Substanz liegen zwei Analysen vor; die eine, mit noch aschenhaltigem Material ausgeführt, ergab folgende Werte:

0,112 g Substanz gaben 0,2241 g CO_2 = 54,96 Proz. C und 0,0626 g H_2O = 6,30 H. (Die Substanz enthielt 0,0125 g Asche, darin 0,00)7 g Baryumsulfat.)

Die mit reinerem Material ausgeführte Analyse ergab:

0,0690 g Substanz gaben 0,1437 g CO_2 = 56,79 Proz. C und 0,0425 g H_2O = 6,89 Proz. H.

0,0716 g Substanz gaben 10 ccm N bei 20,0° und 752,9 mm Hg = 15,86 Proz. N.

Die Substanz ist in kaltem Wasser schwer, besser in kochendem löslich und scheidet sich beim Erkalten wieder aus; in Alkali ist sie leicht löslich und fällt beim Ansäuern mit Essigsäure flockig aus. In absolutem Alkohol ist sie schwer, dagegen in 90proz. und 50proz. Alkohol sehr leicht löslich. Aus der klaren, gelblichen Lösung in 50proz. Alkohol scheidet sie sich in Form von kugeligen, gallertigen Gebilden aus, die jedoch keine Doppelbrechung aufweisen. In absolutem Aceton ist sie nicht, in verdünntem sehr leicht löslich. Sie gibt Biuretreaktion (beim Erwärmen), Millonsche und Xanthoproteïnsäurereaktion. Die Reaktionen von Molisch und Adamkiewicz fehlen. Beim Verbrennen auf dem Platinblech schmilzt sie unter Gasentwickelung und verbreitet zunächst den Geruch nach Phenylisocyanat, dann aber einen aromatischen, an verbrennendes Tyrosin erinnernden Geruch.

Schmelzpunkt und Löslichkeitsverhältnisse machen es sehr wahrscheinlich, daß hier derselbe Körper vorliegt, den Raper bei

Pepsinverdauung aus der Bα-Fraktion erhalten hatte und den er wie folgt beschreibt[1]): „Die . . . Substanz wurde aus der alkalischen visciden Lösung durch Essigsäure gefällt. Aus ihrer Lösung in 50proz. Alkohol schied sie sich in gallertigen Wärzchen aus. Sie schmolz scharf bei 167 bis 169° und änderte den Schmelzpunkt bei weiterem Reinigen nicht. Sie gab nur die Biuretreaktion, war unlöslich in absolutem Alkohol und Aceton, aber sehr löslich in 90proz. Alkohol und verdünntem Aceton.“

Wenn sich die vermutete Identität bestätigt, so ist damit zum ersten Male in exakter Weise gezeigt, daß beim Abbau durch Trypsin zum Teil dieselben Peptone, d. h. Biuretreaktion gebende Polypeptide, auftreten, wie bei der Pepsinverdauung.

Das Filtrat von dem unlöslichen Barytsalz wurde mit Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Es fiel hierbei ein flockiger Niederschlag aus, der abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet, dann mit Äther erschöpft wurde. Die Substanz wurde während der Extraktion wiederholt getrocknet und aufs neue gepulvert.

(Aus dem Äther schieden sich schon in dem Extraktionskolben reichlich weiße, blätterige Massen aus. Der Ätherrückstand wurde mit Ammoniak behandelt, um ihn von Diphenylharnstoff zu befreien; der ungelöst gebliebene Teil wurde aus absolutem Alkohol umkristallisiert. Es schieden sich dabei blätterige Kristalle aus, die, auf Ton von der Mutterlauge befreit und im Vakuum getrocknet, den Schmelzpunkt 168 bis 170° zeigten [ein anderes Präparat schmolz bei 166 bis 168°]; bei weiterem Umkristallisieren änderte sich dieser Schmelzpunkt nicht.

Die Zusammensetzung der bei 100° getrockneten Substanz vom Schmelzpunkt 168 bis 170° war die folgende:

0,0998 g Substanz gaben 0,2611 g CO_2 = 71,36 Proz. C und 0,0603 g H_2O = 6,76 Proz. H.

0,1180 g Substanz gaben 11,79 ccm N bei 20,5° und 759 mm Hg = 11,42 Proz. N.

Beim Verbrennen auf dem Platinblech schmilzt die Substanz und verbrennt mit einem Geruch zunächst nach Phenylisocyanat, sodann nach Eiweiß. Im Reagenzrohr erhitzt, schmilzt sie und sublimiert zum Teil. Sie ist in Kalilauge löslich und wird durch Essigsäure flockig gefällt; der Niederschlag löst sich beim Erwärmen und scheidet sich beim Erkalten wieder aus. In Äther und absolutem Alkohol ist die Substanz ziemlich leicht löslich. Die Biuretreaktion und die Reaktionen nach Millon, Molisch und Adamkiewicz sind negativ; die Xanthoproteïnsäurereaktion ist positiv.

Bei einer früheren Darstellung, wo ich die Ätherextraktion des Rohproduktes ohne vorherige Trennung mit Baryumacetat vornahm, wurde im

[1]) l. c. S. 180.

Ätherrückstand eine Substanz gefunden, die sich aus absolutem Alkohol in weißen, opaken Blättchen abschied, ohne Zersetzung bei 189 bis 191° schmolz und nach einer vorläufigen, mit wenig aschenhaltiger Substanz ausgeführten Bestimmung 15 Proz. N enthielt. Sie gab keine Biuretreaktion, war in Wasser, verdünntem Alkali und verdünnten Säuren unlöslich; in Äther und absolutem Alkohol löslich, aus letzterer Lösung mit Wasser fällbar; die Fällung verschwand beim Erwärmen, trat beim Erkalten wieder auf. Auf dem Platinblech erhitzt, verbreitete die Substanz zunächst den Geruch nach Phenylisocyanat, sodann nach Horn.

Ob es sich bei diesen krystallisierten Produkten um Peptonverbindungen gehandelt hat, bleibt dahingestellt.)

Nach der Ätherextraktion ließ sich die mit Essigsäure fällbare Substanz zu einem leichten, gelblichen Pulver verreiben. Vakuumtrocken schmolz sie unter Zersetzung unscharf bei 110 bis 140°. Beim Verbrennen auf dem Platinblech schmolz sie unter Gasentwickelung, blähte sich stark auf und verbreitete den Geruch nach verbrennendem Horn. In Wasser war sie etwas, besser in kochendem löslich, löste sich in Alkali und fiel beim Ansäuern aus; die Fällung ging beim Erwärmen in Lösung und schied sich beim Erkalten wieder aus. In absolutem Alkohol und Aceton war die Substanz unlöslich, wohl aber löste sie sich darin nach Wasserzugabe schon in der Kälte. Sie gab Biuretreaktion (auch in der Kälte) und starke Xanthoproteïnsäurereaktion; die Reaktionen nach Millon und Molisch waren negativ; die Reaktion nach Adamkiewicz dagegen positiv. Bei der Kalischmelze entwickelte die Substanz fäkalen Geruch; bei der Fichtenspanreaktion trat deutliche, obgleich nicht sehr starke Rotfärbung auf. Die Versuche, das hier offenbar vorliegende Gemenge weiter zu zerlegen, führten nicht zum Ziele.

Ein Produkt von ähnlichem Verhalten konnte weiter aus dem essigsäurehaltigen Filtrat durch Aussalzen mit Natriumchlorid ausgefällt werden. Nach Trennung vom beigemengten Kochsalz mit Hilfe von Aceton, Lösen in wenig Alkali und Fällen mit Essigsäure wurde es in fester Form erhalten. Es schmolz unter Gasentwickelung und Bräunung bei 75 bis 95°. Auch dieses Produkt gab die Indolreaktion mit Glyoxylsäure und bei der Kalischmelze fäkalen Geruch.

3. Fraktion A.

Aus der Lösung des Niederschlages in 5proz. Ammoniumkarbonat wurde auf genau die gleiche Weise wie bei Fraktion B Quecksilber, Schwefelsäure, Ammoniak und Jod beseitigt, die Lösung bei 40° stark eingeengt, mit Phenylisocyanat behandelt,

das gewonnene Kondensationsprodukt in kohlensäurefreiem Alkali gelöst und mit Baryumacetat gefällt. Ebenso wie bei Fraktion B ließ sich auch hier eine Trennung auf Grund der Unlöslichkeit der Barytsalze herbeiführen. Die sehr geringe Ausbeute erlaubte aber eine genauere Verarbeitung nicht. Es sei darüber nur folgendes bemerkt:

Die nach der Fällung mit Baryumacetat im Niederschlag erhaltene Substanz wurde durch zweimaliges Überführen ins Barytsalz gereinigt. Die barytfreie Substanz wurde als leichtes, gelbliches Pulver erhalten, das bei 145° sinterte und unter Zersetzung bei 155 bis 160° schmolz. Sie war in Wasser, auch kochendem, ziemlich schwer löslich und fiel beim Erkalten wieder aus. Die alkalische Lösung wurde in der Kälte von Essigsäure flockig gefällt. In absolutem Alkohol, besonders beim Erwärmen, löste sie sich ziemlich gut; in verdünntem Alkohol äußerst leicht. In absolutem Aceton war sie unlöslich, löste sich aber bei geringstem Wasserzusatz leicht auf. Sie gab Biuretreaktion in der Kälte und starke Xanthoproteïnsäurereaktion; die Reaktionen nach Millon und Molisch waren negativ, die Reaktion nach Adamkiewicz dagegen stark positiv. Die Substanz entspricht in Eigenschaften und Schmelzpunkt dem von Raper ebenfalls als Barytsalz isolierten, bei 155 bis 160° schmelzenden Phenylisocyanat aus Fraktion A [1]) der Pepsinverdauung.

Nach Abtrennung des unlöslichen Barytsalzes wurde das Filtrat mit Essigsäure gefällt. Der im Vakuum getrocknete Niederschlag zeigte folgende Löslichkeitsverhältnisse und Reaktionen: in Wasser, auch in kochendem, war die Substanz schwer löslich und fiel aus der Lösung beim Erkalten aus. In absolutem Alkohol und Aceton war sie auch beim Erwärmen unlöslich; in denselben Lösungsmitteln, mit Wasser verdünnt, löste sie sich leicht. Von den Reaktionen gab sie nur Xanthoproteïnsäurereaktion, schwache Biuretreaktion erst beim Erwärmen.

Durch Sättigung des essigsauren Filtrates von der vorigen Substanz mit Kochsalz konnte ein weiterer Niederschlag erzeugt werden. Die darin enthaltene Substanz zeigte in ihren Löslichkeitsverhältnissen genaue Übereinstimmung mit der vorigen. Im Gegensatz dazu gab sie aber außer der Xanthoproteïnsäurereaktion auch eine sehr starke, schon in der Kälte auftretende Biuretreaktion.

4. Die in 20 proz. Ammoniak lösliche Fraktion

des Quecksilberjodidpepton-Niederschlages lieferte nach Entfernung von Quecksilber, Ammoniak und Jod eine stark gelbe Flüssigkeit, die erst beim Erwärmen eine schwache Biuretreaktion zeigte. Weiter wurde diese Fraktion nicht untersucht.

---

[1]) l. c., S. 172.

3. Der zeitliche Ablauf der Peptonbildung.

Um mich über die Natur der aus Blutalbumin bei längerer Trypsinwirkung entstehenden Produkte, sowie über ihr Verhältnis zu dem von E. Fischer und E. Abderhalden[1]) beschriebenen polypeptidähnlichen Stoff zu orientieren, habe ich folgenden Versuch ausgeführt, wobei ich die Methodik teilweise, um sie der von Fischer benutzten näher zu bringen, umgeändert habe.

200 g Blutalbumin und 20 g Pankreatin wurden unter Zusatz von 2 ccm Ammoniak und etwas Chloroform in 2 Liter Wasser gelöst und unter Toluol bei 40° stehen gelassen. Das Verdauungsgemisch wurde in den ersten Tagen mehrmals täglich, später einmal jeden Tag gründlich durchgeschüttelt. Die Verdauung dauerte 30 Tage. Nach dieser Zeit wurde die Flüssigkeit, die immer noch eine deutliche Biuretreaktion gab, auf dem Wasserbade erhitzt, wobei sich ein ziemlich beträchtliches Koagulum abschied. Das klare Filtrat davon gab nur schwache Biuretreaktion. Es wurde nunmehr unter Toluol für 3 Tage in den Eisschrank gestellt, wobei eine reichliche Ausscheidung von Tyrosin erfolgte. Das Filtrat vom Tyrosinniederschlag wurde auf 4 Liter gebracht, mit Salzsäure versetzt, bis der Gehalt daran 5 Proz. betrug, und mit einem Überschuß von Phosphorwolframsäure gefällt. (Die Verdünnung hatte den Zweck, ein etwaiges Mitausfällen von Phenylalanin zu verhüten.) Der Niederschlag wurde möglichst abgepreßt, dann durch Zusatz von Alkali gelöst und die stark (auf 8 Liter) verdünnte Lösung, um die noch anhaftende Mutterlauge möglichst zu entfernen, durch Salzsäure unter Zugabe von überschüssiger Phosphorwolframsäure zum zweiten Male gefällt. Der möglichst scharf abgesaugte und abgepreßte Niederschlag wurde fein zerrieben und 12 Stunden mit überschüssigem Barythydrat geschüttelt, die von Baryumphosphorwolframat abfiltrierte Lösung nach Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure im Vakuum auf 1 Liter eingeengt und mit festem Ammonsulfat gesättigt.

Die salzgesättigte Flüssigkeit gab auch beim Stehen keinen Niederschlag, ebensowenig bei Zusatz von salzgesättigten Lösungen von Zink- und Kupfersulfat, mit salzgesättigter Eisenammoniakalaunlösung nur eine schwache, allmählich entstehende, nicht filtrierbare Trübung. Sie wurde deshalb direkt mit salzgesättigter Schwefelsäure angesäuert und mit ebenso angesäuerter, salzgesättigter Lösung von Quecksilberjodidjodkalium ausgefällt.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 81; 40, 215.

Der Quecksilberniederschlag bestand anscheinend wie sonst aus zwei Teilen: der eine schied sich sofort in weißen Flocken aus, die zu harten, gelblichen Klümpchen zusammensinterten; der andere bildete anfänglich eine weiße, milchige Emulsion, die sich erst nach 24stündigem Stehen in gelben, öligen Tröpfchen auf dem Boden und den Wänden des Gefäßes abschied. Das klare Filtrat von diesem Niederschlage, mit Wasser auf die Hälfte verdünnt, von Quecksilber befreit und zunächst mit Ammoniak neutral, dann mit Essigsäure schwach sauer gemacht, gab, mit 5proz. Tanninlösung versetzt, keine Trübung.

Der Quecksilberjodidjodkalium-Peptonniederschlag wurde in 10proz. Kaliumjodidlösung aufgelöst, wobei er ohne Rückstand in Lösung ging, aus derselben durch Eintragen von fein gepulvertem Ammonsulfat wieder abgeschieden und mit immer wieder erneuerten Portionen Wasser durchgeknetet, solange etwas in Lösung ging. Dabei löste er sich zum größten Teile. Der in Wasser unlösliche Rückstand ging in 5proz. Ammoniumkarbonatlösung unter Ausscheidung von Quecksilberjodid vollständig in Lösung.

Wie aus diesem Versuche zu entnehmen, ist die bei kurzer Verdauung in reichlicher Menge vertretene Eisenammoniakalaunfraktion nach 30 Tagen nicht mehr im Phosphorwolframsäureniederschlag nachzuweisen. Auch die Löslichkeitsverhältnisse der daraus erhaltenen Jodquecksilberfraktion sind andere als bei kurzdauernder Verdauung. Sie entsprechen eher jenen bei langdauernder Pepsinverdauung, insofern, wie bei Raper, nur zwei Fraktionen zu unterscheiden sind, eine größere, schon in Wasser, und eine kleinere in 5proz. Ammoniumkarbonat lösliche. Jedenfalls ergibt die Phosphorwolframsäurefällung noch in einem vorgeschrittenen Verdauungsstadium ein Gemenge von peptonartigen Produkten.

Daß in der Tat erhebliche Verschiedenheiten in betreff der bei kürzerer und langdauernder Trypsinverdauung nachweisbaren Peptone bestehen, konnte in nachstehendem Dauerversuche, bei dem der Verlauf der Peptonbildung schätzungsweise quantitativ verfolgt wurde, noch genauer sichergestellt werden.

200 g Blutalbumin und 20 g Pankreatin wurden in 4 Liter Wasser gelöst und nach Toluolzusatz unter häufigem Umschütteln bei etwa 40° stehen gelassen. Vom zweiten Tage ab wurden aus dem Verdauungsgemische in bestimmten Zeiträumen abgemessene, stets gleiche Portionen herausgenommen und wie folgt verarbeitet: die ganze Portion wurde zunächst auf dem Wasserbade auskoaguliert, das Filtrat mit festem Ammonsulfat gesättigt, der entstandene Niederschlag abgesaugt. Je 10 ccm des salzgesättigten Filtrates wurden nunmehr mit je 5 ccm von salzgesättigten Lösungen von Zinksulfat,

Kupfersulfat und Eisenammoniakalaun versetzt. Da mit Zinksulfat keine Fällung entstand, die mit Kupfersulfat aber stets gering war, wurde die gesamte Lösung direkt mit Eisenammoniakalaun gefällt, der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat von Eisen befreit und mit Ammonsulfat neuerdings gesättigt. 10 ccm des Filtrates wurden mit 2 ccm salzgesättigter Schwefelsäure und 5 ccm der Raperschen Quecksilberjodidjodkaliumlösung versetzt. Das gesamte Filtrat wurde ebenso mit dieser Lösung ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat zur Hälfte mit Wasser verdünnt, von Quecksilber befreit und ein Volumen von 10 ccm mit 10 ccm 5 proz. Tanninlösung versetzt.

Durch Zusammenstellung der Proben von verschiedener Verdauungsdauer ließ sich ein recht anschauliches Bild von dem Verlaufe der Fermentwirkung gewinnen. Die Ergebnisse des Versuches waren folgende:

Nach 2 Tagen: das Eiweiß ist gelöst, Tyrosin beginnt sich auszuscheiden. Das Hitzekoagulum sehr beträchtlich; der ausgesalzene Albumosenniederschlag spärlich. Das Filtrat gibt mit Zinksulfat[1]), wie auch in allen übrigen Fällen, keine, mit Kupfersulfat starke, sich allmählich absetzende Trübung, mit Eisenammoniakalaun starken Niederschlag, mit dem Raperschen Reagens minimale Fällung. Mit Tannin nachher, wie in allen übrigen Fällen, keine Trübung.

Nach 4 Tagen: Hitzekoagulum bedeutend schwächer, bleibt von hier ab in den folgenden Proben ungefähr gleich; Albumosenfällung etwas schwächer; mit Kupfersulfat schwache Trübung, nach langem Stehen geringer Bodensatz; Eisenammoniakalaunniederschlag etwas schwächer; Niederschlag mit Raperschem Reagens bedeutend stärker.

Nach 6 Tagen: Albumosenniederschlag etwas schwächer; er bleibt von hier ab in den weiteren Proben etwa gleich stark; mit Kupfersulfat wie im vorigen Falle; Eisenammoniakalaunniederschlag auf die Hälfte von dem nach 2 Tagen erhaltenen reduziert; mit Raperschem Reagens starker, öliger Niederschlag.

Nach 9 Tagen: Kupfersulfatniederschlag wie früher; bleibt weiter auf gleicher Höhe; Eisenammoniakalaunniederschlag etwa halb so stark als in der vorigen Probe; Quecksilberjodidniederschlag sehr stark.

Nach 15 Tagen: Eisenammoniakalaunniederschlag etwas schwächer als nach 9 Tagen; Quecksilberjodidniederschlag bedeutend schwächer.

Nach 22 Tagen: genau dasselbe Bild, wie nach 15 Tagen.

---

[1]) Die Salze der Schwermetalle stets mit Ammonsulfat gesättigt.

4. Zusammenfassende Bemerkungen.

So wenig befriedigend das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung im Verhältnis zur aufgewandten Arbeit erscheinen mag, so darf doch die gewonnene Erkenntnis nicht unterschätzt werden, daß die Methode der Fraktionierung mit Schwermetallsalzen in salzgesättigter Lösung bei den Produkten der Trypsinverdauung ebenso wie bei der Pepsinverdauung zu einer besseren Trennung der peptonartigen Produkte führt, als sie sonst erreicht werden kann. Nur ist bei der so viel intensiveren Wirkung des Trypsins die Ausbeute eine weit geringere, und demgemäß wird bei Weiterführung dieser Versuche das Hauptaugenmerk auf den Zeitpunkt zu richten sein, in dem bestimmte Fraktionen besonders reichlich auftreten.

Als feststehende Ergebnisse lassen sich schon jetzt folgende anführen:

Im Gegensatz zu der Pepsinverdauung lassen sich keine mit Zinksulfat (in ammonsulfatgesättigter Lösung) fällbaren Produkte nachweisen, mit Kupfersulfat fällbare aber nur in minimaler Menge. Stark vertreten sind die Eisenammoniakalaun- und die Quecksilberjodidjodkaliumfraktion. Die Abnahme der Eisenfraktion scheint zum Teil mit der Zunahme der Quecksilberfraktion Hand in Hand zu gehen. Die Filtrate von den Quecksilberjodidjodkalium-Niederschlägen geben stets Biuretreaktion; die darin enthaltenen Produkte sind mit Tannin nicht fällbar.

Die Zahl der Peptonfraktionen im Jodquecksilberniederschlag ist größer als bei der Pepsinverdauung; nach längerer Einwirkung des Fermentes (30 Tage) wird sie auf zwei, analog den von Raper bei 6 Wochen dauernder Pepsinverdauung erhaltenen reduziert.

Die als Phenylisocyanatverbindungen erhaltenen Produkte der Trypsinverdauung zeigen zum Teil das gleiche chemische Verhalten wie jene der peptischen Verdauung und sind anscheinend damit identisch; dahin gehören die als unlösliche Barytsalze isolierten Produkte aus den Fraktionen B und A, und zwar:

1. das in 10 proz. Alkohol lösliche, durch Kohlensäure fällbare Phenylisocyanat, F.-P. 167 bis 169° (unkorr.), der Fraktion B, das übrigens in Zusammensetzung und Reaktionen dem von Raper genauer untersuchten, nur vorzugsweise in der A-Fraktion erhaltenen Lysinpepton so nahe steht, daß an völlige Identität gedacht werden muß;

2. das durch Kohlensäure nicht fällbare, ein schwer lösliches Barytsalz bildende Phenylisocyanat, F.-P. 155 bis 160°, der Fraktion A.

Die in diesen Phenylisocyanaten enthaltenen Polypeptide sind sonach gegen Trypsin relativ widerstandsfähig. Das Pepton, welches dem von Raper und mir genauer untersuchten Phenylisocyanate der Fraktion Ab, F.-P. 178 bis 180° (Arginin-Histidin-Pepton), zugrunde liegt, ist mir bei der Trypsinverdauung nicht begegnet. Entweder entsteht es bei Trypsinwirkung nicht, oder wird, was wahrscheinlicher ist, rasch weiter gespalten.

Beachtenswert ist, daß eine Anzahl der erhaltenen Phenylisocyanatverbindungen eine unverkennbare Reaktion nach Adamkiewicz geben, was auf die Anwesenheit von Tryptophan in ihrem Kerne hindeutet. Die Abspaltung des Tryptophans durch Trypsin ist somit wenigstens in der ersten Zeit der Trypsinwirkung keine durchgreifende.

Methodisch bemerkenswert scheint mir endlich, daß die Fällung mit Barytsalzen mit großem Vorteile zur Trennung von sauren Phenylisocyanatverbindungen der Peptone benutzt werden kann.

XVIII.

Zur Kenntnis der Giftsubstanzen des artfremden Blutes.

Von Dr. G. Lefmann,
wissenschaftlichem Assistenten der med. Universitäts-Poliklinik.

(Aus dem pharmakologischen Institute zu Heidelberg. Prof. R. Gottlieb.)

(Mit einer Kurve im Text.)

Die Wirkungen der Bluttransfusion haben wieder an Interesse und Bedeutung gewonnen, seitdem man den Versuch gemacht hat, körperfremdes, dem Blute entstammendes Material auch zu anderen Heilzwecken als zum Ersatze großer Blutverluste zu benutzen. Verwendet wird sowohl artfremdes Blutserum als artgleiches defibriniertes Vollblut[1]). Die Frage nach der Giftigkeit körperfremden Blutes ist deshalb auch von praktischem, jedenfalls aber von großem theoretischen Interesse. Ich habe deshalb auf Veranlassung von Herrn Prof. Gottlieb und anfänglich in Gemeinschaft mit ihm einige Versuchsreihen angestellt, die einen weiteren Beitrag zur Kenntnis der Giftstoffe des artfremden Blutes liefern sollen[2]). Bekannt ist, daß sich im Serum artfremden Blutes Eiweißkörper finden, die bei intravenöser Injektion die Nieren des Blutempfängers schädigen. Ein schlagendes Beispiel von Serumgiftigkeit gibt Brodie[3]), nach dessen Versuchen alle von ihm geprüften Serumarten bei der Katze zu einer vorübergehenden Blutdruckherabsetzung führen. Dies gilt auch vom Katzenserum selbst: Aus den Untersuchungen Brodies scheint jedoch hervorzugehen, daß die aktive Substanz nicht im Plasma gelöst enthalten ist,

---

[1]) Morawitz, Die Behandlung schwerer Anämien mit Bluttransfusionen. Münch. med. Wochenschr. 1907, S. 767.

[2]) Gottlieb und Lefmann, Über die Giftstoffe des artfremden Blutes. Medizinische Klinik 1907, Nr. 15.

[3]) Brodie, The immediate action of an intravenous injection of blood-serum. Journ. of physiol. 26, 48.

sondern erst bei der Gerinnung aus den Blutzellen ins Serum übertritt. Diese giftige Substanz des Serums stammt also aus zerfallenen Blutkörperchen, und daß in denselben Giftstoffe vorhanden sind, ist bekannt. Aber über die Natur dieser Giftstoffe weiß man wenig und kennt als giftige Substanzen aus den Erythrocyten nur die Kalisalze genauer. Sie verursachen die bekannten Vergiftungserscheinungen des Herzens und des Nervensystems, wenn sie bei der rapiden Auflösung der roten Blutkörperchen bestimmter Tierarten durch das Serum des Blutempfängers in genügender Menge in den Kreislauf gelangen. Diese Wirkung der Kalisalze aus den roten Blutkörperchen macht sich bei der Injektion in gleicher Weise geltend, wenn die Impermeabilität der roten Blutkörperchen für dieselben im Reagenzglas aufgehoben wird, wie dies durch Lackfarbenmachen des Blutes mit destilliertem Wasser geschieht. Aber auch dann wirken nur die kalireichen Blutsorten giftig, die kaliarmen keineswegs. Da nun der Kaligehalt der kalireichsten Blutsorten den der kaliarmen um das zwanzigfache übersteigt[1]), so ist es begreiflich, daß die Wirkung des lackfarbenen Blutes sich je nach der verwendeten Blutart sehr verschieden gestalten muß. Während 1000 Gewichtsteile der Blutkörperchen von Katze und Hund nur 0,25 bis 0,29 g K_2O enthalten, beträgt der K_2O-Gehalt der Kaninchenerythrocyten 5,22 g in 1000 Teilen[1]). Dadurch erklärt es sich, daß z. B. lackfarbenes Kaninchenblut, dem Kaninchen intravenös injiziert, die Versuchstiere unter den typischen Erscheinungen der Kalivergiftung des Herzens tötet, während lackfarbenes Hundeblut, auch in größeren Mengen injiziert, beim Kaninchen keinerlei akute Giftwirkung hervorruft. Für diesen Parallelismus zwischen Kaligehalt und Giftwirkung des lackfarbenen Blutes auf das Herz geben die Versuche von Langendorff[2]) und Brandenburg[3]) am isolierten Herzen schlagende Beweise: lackfarbenes Kaninchenblut ruft akute Giftwirkung auf das isolierte Kaninchen- und Froschherz hervor, während die Tätigkeit des überlebenden Hundeherzens bei der Speisung mit lackfarbenem Hundeblut und die des Katzenherzens mit lackfarbenem Katzenblut ungestört vor sich geht, und beide Blutsorten die Tätigkeit des Froschherzens gut unterhalten. Zur weiteren Illustration dieser Tatsachen mögen

[1]) Vgl. Abderhalden, Zeitschr. f. physiolog. Chem. 23, 521 (1897) und 25, 65 (1898).

[2]) O. Langendorff, Über die angebl. Unfähigkeit des lackfarbenen Blutes, den Herzmuskel zu ernähren. Pflüg. Arch. f. Physiol. 93, 286 (1903).

[3]) E. Brandenburg, Die Wirkung des lackfarbenen Blutes auf das isolierte Froschherz. Pflüg. Arch. f. Physiol. 95, 625 (1903).

die beiden folgenden Versuche dienen, die von mir gelegentlich als Kontrollversuche angestellt wurden, und von denen der eine die starke Giftigkeit des lackfarben gemachten Kaninchenblutes, der andere die völlige Ungiftigkeit des lackfarbenen Hundeblutes zeigt.

Versuch I.

Kaninchen, 1480 g, erhält innerhalb 5 Minuten 18 ccm mit der doppelten Menge destillierten Wassers lackfarben gemachten und mit Kochsalz wieder auf Isotonie gebrachten Kaninchenblutes. Während der Injektion in die Vena jugularis sinkt der Blutdruck ohne Prodromalerscheinungen von 78 mm Hg plötzlich zur Abszisse. Herztod. Erst nach dem Herzstillstande treten Krämpfe auf.

Versuch II.

Kaninchen, 800 g, erhält in 3 Minuten 20 ccm mit der doppelten Menge destillierten Wassers lackfarben und mit Kochsalz wieder isotonisch gemachten Hundeblutes in die Vena jugularis injiziert. Nach der Injektion sinkt der Blutdruck von 116 mm Hg auf 112 mm Hg. Sonst keine Erscheinungen.

Für die Kaliwirkung gelöster Blutkörperchen ist nach dem Gesagten nur die verwendete Blutsorte, nicht aber die Tierart des Blutempfängers entscheidend. Wie aus Versuch II hervorgeht, werden dabei recht beträchtliche Mengen gewisser Blutarten gut vertragen, während andere, und zwar keineswegs ihrem Kaligehalt entsprechend, schon in geringer Menge giftig wirken, wie z. B. dem Kaninchen injiziertes Schweineblut.

Aber auch kaliarmes Blut wirkt unter Umständen giftig. Batelli[1]) und Mioni[2]) stellten fest, daß rote Blutkörperchen intravenös injiziert immer giftig wirken, wenn das Serum des Blutempfängers die Fähigkeit besitzt, die injizierten Blutkörperchen rasch aufzulösen. Es gilt dies namentlich auch für solche Blutkörperchen, die bei der Injektion an eine andere Tierart, in deren Serum sie nicht gelöst werden, gänzlich unwirksam bleiben und auch lackfarben gemacht keine Giftwirkung entfalten. Dies läßt sich nur dadurch erklären, daß die roten Blutkörperchen zweierlei Arten von giftigen Substanzen enthalten, einmal die Kalisalze, welche schon bei der Wasserhämolyse frei werden, und zweitens Giftstoffe bisher unbekannter Art, die erst bei der Auflösung der Stromata durch das hämolytisch wirkende Serum des Blutempfängers in den Kreislauf gelangen. Ein Beispiel mag

[1]) Batelli und Mioni, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 56, 848 u. 1041 (1904).

[2]) Mioni, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 56, 762 (1904).

dies erläutern. Die intravenöse Injektion von lackfarbenem Hundeblut hat keinen Einfluß auf die Herztätigkeit und den Blutdruck des Kaninchens; selbstverständlich ist dies auch nicht der Fall bei der Injektion von defibriniertem, sonst intaktem Hundeblut. Löst man jedoch das Hundeblut vor der Injektion durch das Serum eines Kaninchens, das gegen Hundeblut immunisiert worden war, auf, so beobachtet man eine sehr energische Giftwirkung an dem Kaninchen, wie dies die Versuche IV und V demonstrieren. Um die Ungiftigkeit einer Transfusion von defibriniertem Hundeblut am Kaninchen zu erhärten, sei das Protokoll eines solchen Kontrollversuches (III) vorausgeschickt.

Versuch III.

Kaninchen, 1250 g, erhält innerhalb 3 Minuten 10 ccm defibrinierten Hundeblutes in 40 ccm Kochsalzlösung intravenös injiziert. Der Blutdruck steigt während der Injektion von 92 mm Hg auf 110 mm Hg. Das Tier bleibt am Leben.

Versuch IV.

10 ccm defibrinierten Hundeblutes wurden mit 76 ccm Blutserum eines Kaninchens, das gegen Hundeblut immunisiert worden war und dessen Serum Hundeblutkörperchen stark hämolysierte, versetzt und 3 Stunden im Brutschrank belassen. Nach Auflösung des Hundeblutes wurden einem Kaninchen von 1500 g 44 ccm der obigen Mischung — entsprechend etwa 6 ccm Hundeblut — in einem Zeitraum von 3 Minuten intravenös injiziert. Der Blutdruck sank von 100 mm Hg auf 48 mm Hg und blieb dauernd niedrig. Der Versuch wurde dann abgebrochen. Am anderen Morgen lag das Tier tot im Käfig.

Versuch V.

Von der gleichen Mischung von Hundeblut und Kaninchenserum wie in Versuch IV wurden einem Kaninchen von 1050 g in 2 Minuten 19 ccm in die Vena jugularis injiziert. Der Blutdruck sank zunächst von 100 mm Hg auf 54 mm Hg: danach wurden nochmals in 3 Minuten 9 ccm injiziert — im ganzen also eine etwa 4 ccm Hundeblut entsprechende Menge —, worauf unter Krämpfen und starker Blutdrucksenkung der Tod eintrat.

Schon Batelli hatte einen Versuch gemacht, aus dem hervorgeht, daß immunisierte Kaninchen für die Stromabestandteile des betreffenden artfremden Blutes giftempfindlich sind, und daß das Ausbleiben jeder akuten Giftwirkung beim nicht vorbehandelten Versuchstier darauf beruht, daß artfremde Erythrocyten im normalen Kaninchenorganismus nicht sofort zugrunde gehen, während sie bei den vorbehandelten Kaninchen rasch zerfallen und ihre Giftwirkung entfalten können. Ebenso wie solche gegen artfremdes Blut immunisierte Kaninchen verhält sich z. B. der Hund von vornherein gegen Injektionen von defibriniertem Kaninchenblut, da das

Hundeserum in hohem Maße die Fähigkeit hat, Kaninchenblutkörperchen zu hämolysieren. Durch Batelli und Mioni war auch bereits bekannt, daß Kaninchenblutkörperchen - Injektionen den Blutdruck des Hundes stark herabsetzen; in größeren Mengen in den Kreislauf gebracht, führen sie den Tod des Hundes herbei, wie dies bei früheren Versuchen [1]) auch von mir regelmäßig beobachtet wurde. Auf den Einfluß der Kalisalze kann dies nicht zurückgeführt werden, denn trotz der starken Hämolyse, der das intravenös eingeführte Kaninchenblut unterliegt, ist das Vergiftungsbild ein ganz anderes als bei der Kalivergiftung, außerdem enthielt die eingeführte Blutmenge nicht so viel Kalisalze, daß dadurch allein der Tod der Tiere erklärt werden könnte. Die Hunde boten vielmehr trotz der angewandten Morphinnarkose bald Zeichen eines starken Schmerzes. Sie wurden unruhig und warfen sich, schrieen auch öfters laut auf, um dann allmählich in ein Stadium tiefer Lethargie überzugehen; dabei wurden Atmung und Herzschlag beschleunigt (Wegfall des zentralen Vagustonus), der Blutdruck ging, wie aus der nebenstehenden Kurve ersichtlich ist, langsam bis nahe zur Abszisse herunter, blieb einige Zeit niedrig und stieg dann ganz allmählich wieder an. In nicht wenigen Fällen sistierte auch die Atmung völlig und mußte durch künstliche Respiration ersetzt werden. So sank beispielsweise in einem Falle der Blutdruck von 180 mm Hg auf 78 mm Hg: der Hund hatte 50 ccm

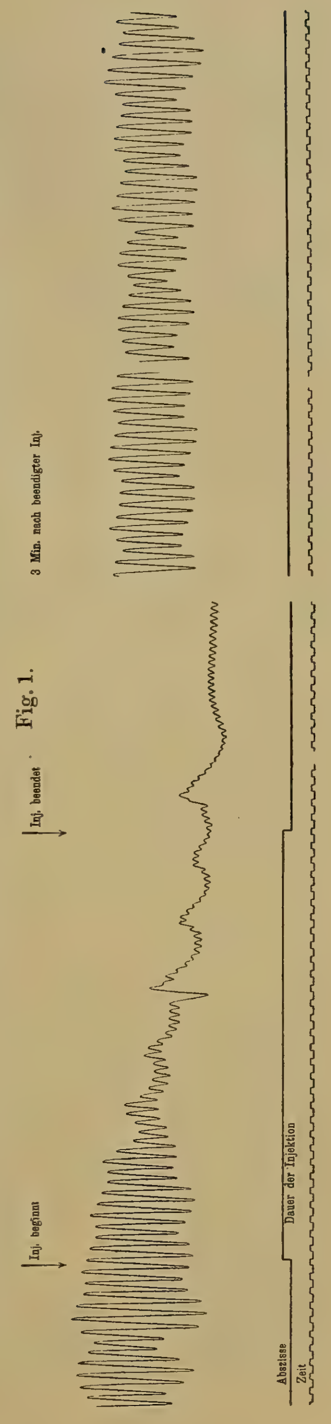


Fig. 1.

[1]) G. Lefmann, Diese Beiträge 9, 80.

Kaninchenblut, d. h. 5 pro Kilogramm seines Körpergewichtes in 2 Minuten erhalten. Die Menge des eingeführten Blutes war also eine relativ sehr kleine; eine Menge von 5 ccm pro Kilogramm genügte jedoch stets, um eine starke Blutdrucksenkung hervorzubringen. Das geschilderte Vergiftungsbild kam auch zustande, wenn die wasserlöslichen Substanzen, also auch die Kalisalze, aus den Kaninchenblutkörperchen zuvor entfernt waren und man statt derselben nur die Stromata verwendete. Die Bereitung der Stromata geschah nach der von Sachs[1]) gegebenen Vorschrift; es wurde schließlich eine grauweißliche Masse erhalten, die auf das ursprüngliche Blutvolumen mit Kochsalzlösung verdünnt und gut durchgeschüttelt wurde. Zum Beweise ihrer Giftigkeit dient am besten folgender Versuch:

Versuch VI.

Hund, 5200 g, erhält in 6 Minuten 25 ccm, d. h. etwa 5 pro Kilogramm, Kaninchenblutstromata. Der Blutdruck sinkt während der Injektion langsam von 156 mm Hg auf 18 mm Hg, um dann allmählich zur früheren Höhe anzusteigen. Tier wird nach der Injektion verblutet.

Es geht aus diesem Versuch hervor, daß die wirksame Giftsubstanz im Stroma der roten Blutkörperchen enthalten ist, und daß sie entweder fest an das Stroma gebunden oder in Wasser bzw. Kochsalzlösung unlöslich ist. Es war daher, um die Giftsubstanz einigermaßen zu isolieren, notwendig, andere Lösungsmittel zu verwenden, und als das zweckmäßigste Verfahren erwies sich mir die Ätherausschüttelung nach Bang und Forssmann[2]), ein Verfahren, das sich, wie aus einer früheren Mitteilung[3]) ersichtlich ist, durchaus bewährt hat. Hierzu wurde das zu untersuchende Blut nach der Entnahme defibriniert und die Blutkörperchen durch Zentrifugieren vom Serum getrennt, danach sechsmal mit 0,85 proz. Kochsalzlösung gewaschen und mit Quarzsand zu einem gleichmäßigen Brei verrieben. Dieser Brei wurde sechsmal je 2 Stunden auf der Schüttelmaschine mit Äther extrahiert. Danach wurde die abgegossene Äthermenge auf das ursprüngliche Volumen der Blutmenge eingeengt. Direkt vor dem Tierversuch wurde der Äther meist unter dem Gebläse durch einen Luftstrom bis auf 3 bis 4 ccm verjagt und unter Zusatz von 2 bis 3 ccm Alkohol in

---

[1]) H. Sachs, Zur Kenntnis des Kreuzspinnengiftes. Diese Beiträge 2, Heft 1—3.

[2]) Bang und Forssmann, Beiträge 8, 238.

[3]) R. Gottlieb und G. Lefmann, Mediz. Klinik 1907.

Kochsalzlösung gegossen, wobei gewöhnlich eine gleichmäßige Emulsion entstand. Diese Emulsion wurde, nachdem sie zuvor durch ein feinmaschiges Tuch koliert worden war, wie das früher verwendete Blut intravenös injiziert. Als sich nun herausstellte, daß die ätherlöslichen Bestandteile, die zunächst aus Kaninchenblutkörperchen bereitet und an Hunden geprüft worden waren, stets dieselben Erscheinungen hervorriefen wie das früher verwendete Kaninchenblut, da erhob sich die Frage nach dem allgemeinen Vorkommen derartiger durch Äther extrahierbarer Stoffe, die nach dem Vorgang von Bang und Forssman als Lipoidsubstanzen bezeichnet werden mögen, in den roten Blutkörperchen und nach ihrer Einwirkung auf den artfremden und auf den artgleichen Organismus. Die Übereinstimmung der Vergiftungssymptome einerseits bei Injektion der Blutkörperchenlipoide und andererseits bei der Giftwirkung der verschiedenen Vollblutarten, für deren Blutkörperchen das Serum des Blutempfängers ein Hämolysin enthält, sprach dafür, daß die Lipoidsubstanzen an der Giftwirkung der gelösten artfremden Blutkörperchen beteiligt sind. Über ihre Einwirkung auf artgleiche Tiere ließ sich jedoch überhaupt nichts mutmaßen, da unter normalen Umständen Isolysine im Serum nicht vorhanden sind, artgleiche Blutkörperchen also nicht gelöst werden. Um über diese Fragen Aufschluß zu erhalten, wurden an verschiedenen Tierarten Versuche sowohl mit artfremden, als mit artgleichen Lipoidsubstanzen ausgeführt, und zwar am Hunde, an der Katze und am Kaninchen.

A. Versuche am Hunde.

Versuch VII.

Hund, 3120 g, erhielt in Morphinnarkose innerhalb 2 Minuten 11 ccm Kaninchenblutätherextrakt, die ebensoviel Cubikcentimeter Kaninchenblut entsprachen (3,7 pro Kilogramm). Der Blutdruck sank bald nach Beginn der Injektion von 75 mm Hg auf 12 mm Hg, stieg dann allmählich wieder an. 30 Minuten nach Beginn der ersten Injektion wurden abermals 11 ccm des gleichen Extraktes (3,7 pro Kilogramm) infundiert. Der Blutdruck sank von 35 mm Hg auf 11 mm Hg und stieg dann allmählich wieder an. Während der Injektion war das Tier unruhig, atmete rascher wie zuvor, auch die Pulsfrequenz nahm zu. Tötung durch Verbluten.

Versuch VIII.

Hund, 4500 g, erhält in 4 Sekunden 4 ccm einer Kaninchenblutextraktemulsion, die 35 ccm Kaninchenblut entsprachen (7,7 pro Kilogramm). Der Blutdruck sank zunächst rapid von 90 mm Hg auf 21 mm Hg, hielt sich einige Zeit auf dieser Höhe und sank dann langsam zur Abszisse. Tod des Tieres.

Die Giftigkeit des Kaninchenblutätherextraktes für den Hund steht nach diesen Versuchen außer Zweifel. Allerdings scheinen die Lipoide der Kaninchenblutkörperchen nicht ganz so giftig zu wirken als natives Kaninchenblut, da die Menge Ätherextrakt, die nötig war, um eine deutliche Wirkung zu erzielen, fast immer größer ist, als die wirksame Menge von Kaninchenblut. Es kann dies auf Substanzverluste bei der Bereitung und beim Kolieren der Emulsion oder auf ungenügende Ausschüttelung zurückgeführt werden. Jedenfalls kann man durch die Injektion von Kaninchenblutlipoidemulsion die gleichen Erscheinungen, Blutdrucksenkung, Atmungs- und Pulsbeschleunigung, an Hunden hervorrufen, wie mittels nativer Kaninchenblutkörperchen. Bei Zuführung größerer Mengen von Lipoidsubstanzen erfolgte der Tod; aber wenn die Tiere nicht während der Versuche eingingen, und wenn der Blutdruck nach vollendeter Injektion wieder in die Höhe ging, so blieben sie meistens am Leben, im Gegensatz zu den bei den Versuchen mit nativem Kaninchenblut verwendeten Hunden, die ausnahmslos an den Folgen der Injektion zugrunde gingen. Danach scheinen die Giftsubstanzen entweder bei dem geübten Verfahren nicht vollständig in Äther überzugehen oder es sind überhaupt nicht alle Giftsubstanzen der Stromata ätherlöslich. Auch ein anderer Unterschied zwischen der Einwirkung von nativen Blutkörperchen und den Lipoiden des Kaninchens muß hier Erwähnung finden. War nach der Injektion der Kaninchenblutkörperchen der Blutdruck des Hundes gesunken, so vermochte eine zweite Injektion von Kaninchenblutkörperchen keine weitere Senkung hervorzurufen; dies beruht auf dem Unvermögen des Hundeserums, die bei der zweiten Injektion in den Kreislauf gelangten artfremden Blutkörperchen aufzulösen. Die Lipoidemulsion wirkte indessen bei jeder neuen Injektion von neuem blutdrucksenkend (vgl. Versuch VII), da eine Mitwirkung des Serums des Blutempfängers dabei nicht in Frage kommt.

Von artfremden Lipoiden wurden am Hunde noch Katzenlipoide auf ihre Wirkung geprüft. Die Bereitung derselben geschah in der gleichen Weise, ihre Wirkung war jedoch geringer als die der Kaninchenlipoide, wie aus den folgenden Versuchen ersichtlich ist.

Versuch IX.

Hund, 8000 g, erhält in Morphinnarkose in 2 Minuten 40 ccm Katzenlipoidemulsion, entsprechend 80 ccm Katzenblut (10 pro Kilogramm). Der Blutdruck sank von 140 mm Hg auf 80 mm Hg. Nach der Injektion war das

Tier, das sich vorher lebhaft bewegt hatte, schlaff gelähmt, der Cornealreflex fehlte, die Atmung war dyspnoisch und aussetzend. N. vagus bei 20 mm Rollenabstand (8 Einheiten) erregbar. Allmählich besserte sich der Zustand des Tieres, der Blutdruck stieg, die Atmung wurde ruhiger und regelmäßiger; 40 Minuten nach Beendigung der Injektion ist das Tier völlig munter und läuft umher. Bleibt am Leben.

Versuch X.

Hund, 4500 g, erhält in 2 Minuten 40 ccm Katzenlipoidemulsion, entsprechend 80 ccm Katzenblut intravenös injiziert (17,7 pro Kilogramm). Nach der Injektion sinkt der Blutdruck von 122 mm Hg auf 92 mm Hg, die Atmung wird beschleunigt, die Muskulatur erschlafft; allmählich steigt der Blutdruck wieder, das Tier erholt sich, bleibt am Leben.

Wie aus diesen Versuchsprotokollen hervorgeht, wurden durchschnittlich größere Mengen von Katzenlipoiden als von Kaninchenlipoiden verwendet, und obwohl die Tiere nach der Injektion von Katzenlipoiden stets schwer vergiftet waren, der Blutdruck stark sank, die Atmung beschleunigt und die Muskulatur schlaff wurde, also die nämlichen Erscheinungen eintraten, wie nach der Injektion von Kaninchenlipoiden, blieben die Hunde fast stets am Leben. Es scheint mir hieraus hervorzugehen, daß die Katzenlipoide für den Hund entweder weniger giftig sind als die Kaninchenlipoide, oder daß aus Katzenblut weniger von diesen ätherlöslichen Giftstoffen extrahiert wird als aus Kaninchenblut. Derartige quantitative Unterschiede entsprechen durchaus den Erfahrungen, die man sonst bei der Injektion artfremden Blutes hinsichtlich seiner Giftigkeit macht, wenn das Serum des Blutempfängers gleich stark hämolytisch auf verschiedene Blutsorten einwirkt. Von prinzipieller Bedeutung ist jedoch, daß auch das Katzenblut Lipoidsubstanzen enthält, die für den Hund giftig sind.

Ganz anders gestalteten sich die Versuche mit Hundelipoiden an Hunden. Die hierzu nötigen Emulsionen werden genau in der früher angegebenen Weise bereitet.

Versuch XI.

Hund, 4000 g, erhält in 10 Minuten 50 ccm Hundelipoide, entsprechend 80 ccm Hundeblut (20 pro Kilogramm). Blutdruck steigt während der Injektion von 196 mm Hg auf 198 mm Hg, sonstige Erscheinungen treten nicht ein. Tier bleibt am Leben.

Versuch XII.

Hund, 4200 g, erhält innerhalb 3 Minuten 45 ccm Hundelipoide, entsprechend 90 ccm Hundeblut (21,4 pro Kilogramm) intravenös injiziert. Die Atmung blieb ruhig, der Hund zeigte keine abnormen Erscheinungen. Der Blutdruck sank nach Injektion von 150 mm Hg auf 140 mm Hg. Tier blieb am Leben.

Während also die Injektion artfremder Lipoidemulsionen stets eine starke Vergiftung des Hundes zur Folge hatte, wurden artgleiche Lipoidemulsionen vom Hunde stets gut ertragen. Weder am Blutdruck noch an der Atmung noch sonst irgendwie zeigten sich bedrohliche Erscheinungen. Dabei wurden stets größere Mengen (20 bzw. 21,4 ccm pro Kilogramm in Versuch XI und XII) artgleicher Lipoidsubstanzen eingeführt als artfremder. Auch wurden die verwendeten Lipoidsubstanzen stets auf ihre Giftigkeit für artfremde Tiere, Katze und Kaninchen, geprüft, um der Wirksamkeit der Emulsion sicher zu sein. Schließlich wurden auch die zu den Versuchen mit artgleichen Lipoiden verwendeten Hunde auf ihre Empfindlichkeit gegen artfremde Lipoide geprüft, wie dies z. B. im folgenden Versuche geschah:

Versuch XIII.

Hund, 3200 g, erhält innerhalb 2 Minuten 25 ccm Hundelipoide, entsprechend 50 ccm Hundeblut (14,3 pro Kilogramm) intravenös injiziert. Blutdruck steigt während der Injektion von 112 mm Hg auf 134 mm Hg. Tier ganz normal. Nach 7 Minuten Injektion von 25 ccm Katzenlipoiden, entsprechend 50 ccm Katzenblut (14,3 pro Kilogramm) in die gleiche Vene. Blutdruck sinkt von 134 mm Hg auf 80 mm Hg. Allmählicher Wiederanstieg des Blutdrucks. Tier wird verblutet.

Aus den angeführten Versuchen, die mehrfach wiederholt wurden und stets in der gleichen Weise ausfielen, geht demnach hervor, daß Kaninchen- und Katzenlipoide für den Hund giftig, Hundelipoide aber ungiftig sind.

B. Versuche an der Katze.

An der Katze wurden Versuche mit Kaninchen-, Hunde- und Katzenlipoiden angestellt. Die Versuche wurden dadurch etwas erschwert, daß die Katze gegen intravenöse Blutinjektionen überhaupt sehr empfindlich ist; bei einer Injektion von defibriniertem Katzenblut sank beispielsweise der Blutdruck von 141 mm Hg auf 135 mm Hg. Diese auch von Brodie konstatierte Empfindlichkeit der Katzen wurde schon früher erwähnt. Im übrigen waren die Resultate jedoch bei der Injektion von artgleichen und von artfremden Lipoidemulsionen derartig verschieden, daß sie sehr wohl in den Rahmen der übrigen Versuchsergebnisse hineinpassen.

Versuch XIV.

Katze, 3000 g, erhielt in $^1/_2$ Minute 12,5 ccm Kaninchenlipoidemulsion, entsprechend 25 ccm Kaninchenblut (8,3 pro Kilogramm) intravenös injiziert;

der Blutdruck sank von 148 mm Hg auf 48 mm Hg. Das Tier zeigte Schmerzäußerungen, die Atmung blieb stehen, erholte sich jedoch nach wenigen Minuten wieder. Auch der Blutdruck stieg wieder an. Nach 11 Minuten weitere Injektion von 10 ccm Kaninchenlipoiden in 1 Minute, entsprechend 20 ccm Kaninchenblut (6,6 pro Kilogramm). Der Blutdruck sank von 164 mm Hg auf 54 mm Hg, die Atmung stand still, erholte sich jedoch wieder. Auch der Blutdruck stieg wieder auf 158 mm Hg. Das Tier wurde abgespannt, die Corneal- und Hautreflexe fehlten völlig. Trotz hohen Blutdruckes völlig ausgebildete schlaffe Lähmung. Tier blieb am Leben.

Versuch XV.

Katze, 3000 g, erhielt in $1^1/_2$ Minuten 14 ccm Hundelipoidemulsion, entsprechend 28 ccm Hundeblut (9,3 pro Kilogramm) intravenös injiziert. Der Blutdruck blieb anfänglich hoch, trotz eintretenden Atemstillstandes. Die Cornealreflexe fehlten nach vollendeter Injektion. Allmählich ging auch der Blutdruck, der zuvor 180 mm Hg betragen hatte, auf 34 mm Hg herunter. Tod des Tieres 3 Minuten nach der Injektion.

Das Vergiftungsbild, das Kaninchen- und Hundelipoide an der Katze hervorrufen, ist demnach etwas abweichend von dem am Hunde beobachteten. Die Blutdruckveränderungen treten gegenüber den allgemeinen schweren Vergiftungs- und Lähmungserscheinungen mehr in den Hintergrund, obwohl auch bei der Katze Blutdrucksenkungen nie ausblieben. Allerdings waren dieselben mehr vorübergehender Art, während die übrigen Erscheinungen länger andauerten, wie dies z. B. der angeführte Versuch XV zeigt. Die benötigten Mengen waren weder für die Kaninchen- noch für die Hundelipoide besonders groß. Um eine deutliche Giftwirkung hervorzurufen, genügten etwa 6 bis 10 ccm pro Kilogramm.

Etwas eingehender müssen jedoch die Einwirkungen der Katzenlipoide an der Katze betrachtet werden, wie sie die folgenden Versuchsprotokolle wiedergeben.

Versuch XVI.

Katze, 1900 g, erhält in 2 Minuten 14 ccm Katzenlipoidemulsion, entsprechend 28 ccm Katzenblut (14,7 pro Kilogramm) intravenös injiziert. Der Blutdruck sinkt von 128 mm Hg auf 122 mm Hg, das Tier zeigt sonst keine Störungen. Bleibt am Leben.

Versuch XVII.

Katze, 1750 g, erhält in 4 Minuten 50 ccm Katzenlipoidemulsion, entsprechend 50 ccm Katzenblut (28,5 pro Kilogramm) intravenös injiziert. Der Blutdruck sinkt von 142 mm Hg auf 120 mm Hg, das Tier bleibt jedoch munter und zeigt keine Spur von Narkose.

Versuch XVIII.

Katze, 1650 g, erhält in 2 Minuten 25 ccm Katzenlipoidemulsion, entsprechend 50 ccm Katzenblut (30 pro Kilogramm) intravenös injiziert. Der Blutdruck sinkt von 110 mm Hg zur Abszisse. Tier nach Beendigung der Injektion tot.

Versuch XIX.

Katze, 2350 g, erhält in 3 Minuten 25 ccm Katzenlipoidemulsion, entsprechend 50 ccm Katzenblut (21,2 pro Kilogramm) intravenös injiziert. Blutdruck sinkt von 166 mm Hg auf 146 mm Hg. Tier sonst normal. Nach 20 Minuten weitere Injektion von 25 ccm Hundelipoidemulsion, entsprechend 50 ccm Hundeblut (21,2 pro Kilogramm). Der Blutdruck, der wieder auf 164 mm Hg gestiegen war, sinkt auf 112 mm Hg. Die Muskulatur ist völlig schlaff, die Atmung erfolgt stoßweise (Frequenz 14 bis 16 pro Minute). Der Cornealreflex fehlt. Nach dem Abspannen zeigt das Tier keine Reaktion auf Kneifen der Zehen usw. Die Atmung wird allmählich besser, es treten tonische und klonische Muskelkrämpfe auf, Pupillen sind maximal erweitert, völlige Reaktionslosigkeit. Nach 45 Minuten Wiederauftreten des Cornealreflexes, ruhigere Atmung. Tier kann sitzen, aber noch nicht stehen. Bleibt am Leben.

Die Versuche XVI, XVII und XVIII zeigen eine deutliche Zunahme der Giftwirkung der artgleichen Lipoidemulsion proportional der injizierten Menge; während 14,7 ccm pro Kilogramm noch gut vertragen wurden, sank bei 28,5 pro Kilogramm der Blutdruck, ohne daß sonstige Erscheinungen auftraten. Bei 30,0 pro Kilogramm trat der Tod ein. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der Ungiftigkeit artgleicher Blutkörperchenlipoide am Hunde und, wie wir später sehen werden, mit den damit analogen am Kaninchen gewonnenen Versuchsergebnissen. Vom Hunde wurden artgleiche Lipoide in einer Menge von 20,0 und 21,4 pro Kilogramm gut vertragen und ebenso lösten 23,0 pro Kilogramm beim Kaninchen keine Giftwirkung aus. Worauf das abweichende Verhalten der Katze beruht, läßt sich nicht sagen. Zufälligkeiten bei der Versuchsanordnung können wir nicht annehmen, da die Versuche mehrfach wiederholt stets das gleiche Ergebnis hatten. Indessen besteht doch insofern eine Übereinstimmung der Katzenversuche mit den am Hunde erhaltenen Resultaten, als auch an der Katze artfremde Lipoide ungleich giftiger wirkten als artgleiche, wie dies z. B. aus Versuch XIX deutlich hervorgeht, in dem 21,2 pro Kilogramm Katzenlipoide ohne weiteres vertragen wurden, während die Injektion der gleichen Menge Hundelipoide schwere Störungen, Narkose und Krämpfe, zur Folge hatte. Es sind also für die Katze Hunde-, Kaninchen- und Katzenlipoide giftig, letztere aber erst in weit größerer Menge als die beiden ersteren.

C. Versuche am Kaninchen.

Am Kaninchen wurden außer Hunde-, Katzen- und Kaninchenlipoiden noch Schweine- und Rinderlipoide geprüft, um die Wirksamkeit verschiedener Lipoidarten untereinander vergleichen zu können. Die Bereitung der Emulsion geschah gewöhnlich in der beschriebenen Weise, nur die Rinderlipoide wurden in der Weise gewonnen, daß der Blutkörperchenbrei zunächst bei etwa 30° im Vakuum zur Trockne gebracht und das so erhaltene Pulver 24 Stunden im Soxhletapparat extrahiert wurde, ein Verfahren, auf das später kurz noch eingegangen werden soll. Im übrigen können wir auf eine Wiedergabe der vollständigen Versuchsprotokolle bei den Kaninchenversuchen verzichten, da dieselben im großen und ganzen den Hundeversuchen gleichen. Die Injektion erfolgte stets in die Vena jugularis, der Blutdruck wurde in der Carotis gemessen. Die artfremden Lipoide riefen regelmäßig Blutdrucksenkung, beschleunigte Atmung und erhöhte Pulsfrequenz hervor, wie dies schon früher bei der Katze und beim Hunde beschrieben wurde. Die narkotisierende Wirkung der Emulsion kam weniger deutlich zum Vorschein, weil die Kaninchen meist urethanisiert waren und für die Beobachtung der ersten Narkosesymptome ungeeignetere Objekte sind als Katze und Hund. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Giftigkeit der einzelnen Lipoidarten beim Kaninchen.

	pro Kilogramm	Blutdruck	Dauer der Injektion in Minuten	Verlauf
Hundelipoide . .	6,6	120— 0	1,5	tot
Rinderlipoide . .	12,7	100— 0	1,0	tot
Schweinelipoide .	14,1	102—46	2,0	verblutet
Katzenlipoide . .	14,2	120—48	5,0	—
Kaninchenlipoide .	25,0	90—86	3,0	bleibt am Leben

Am giftigsten wirken nach dieser Tabelle die Hunde- und die Rinderlipoide, weniger die Schweine- und die Katzenlipoide. Die Kaninchenlipoide riefen überhaupt keine Giftwirkung beim Kaninchen hervor. Diese Beobachtung entspricht durchaus nicht den Erfahrungen, die bei der Transfusion der entsprechenden artfremden intakten Blutkörperchen gemacht wurde. Unveränderte Katzenblutkörperchen wurden beim Kaninchen allerdings nicht injiziert. Von den übrigen Blutarten wirken erfahrungsgemäß am giftigsten die Schweineblutkörperchen, weniger die Hundeblutkörperchen

und erst in sehr großen Mengen die Rinderblutkörperchen. Diese Inkongruenz ist aber ohne weiteres verständlich, wenn man sich das Zustandekommen der Giftwirkung bei Injektionen artfremder Blutkörperchen, wie es zu Beginn dieser Arbeit geschildert wurde, vergegenwärtigt und namentlich für das Schweineblut die Wirkung der Kalisalze berücksichtigt. Wollte man den Versuch machen, festzustellen, ob aus verschiedenen Blutsorten hergestellte Lipoidemulsionen hinsichtlich ihrer Giftigkeit mit den verwendeten Blutarten genauer übereinstimmen, so müßte man einmal die Wirkung der Kalisalze ausschalten, also nur Blutkörperchenschatten verwenden; ferner aber müßte der Hämolysingehalt des Serums des Blutempfängers für alle verwendeten Blutsorten ganz gleich sein, eine Forderung, der kein Versuchstier entspricht und die sich auch durch vorherige immunisatorische Behandlung nicht erreichen läßt. Von prinzipieller Bedeutung ist jedoch die Tatsache, daß alle verwendeten artfremden Lipoidemulsionen mehr oder minder stark giftig wirken, während die artgleichen Lipoide selbst in sehr großer Menge gänzlich wirkungslos blieben. Dieser Befund stimmt durchaus mit den am Hunde erhobenen überein.

Die ätherlösliche, giftige Substanz der artfremden Blutkörperchen wurde bisher kurz als Lipoidsubstanz bezeichnet, im Anschluß an die gleichartige Nomenklatur von Bang und Forssman, die in den roten Blutkörperchen zahlreiche chemisch nicht genau charakterisierte Substanzen festgestellt haben, die sie mit den Immunkörpern — den natürlichen sowohl wie den künstlich erzeugten — in Beziehung bringen. Inwieweit es sich hier um Cholesterine und Lecithine oder auch um Substanzen handelt, die mit den Eiweißkörpern in Beziehung stehen, d. h. um Verbindungen der Lecithine mit Eiweiß, soll nicht genauer erörtert werden. Die Lipoidsubstanzen geben jedenfalls zum Teil die Biuretreaktion. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß sich aus dem Ätherextrakt der roten Blutkörperchen durch fraktionierte Darstellung Körper von verschiedener physiologischer Wirkung isolieren ließen, und daß sich eine genauere Definierung des Giftstoffes oder, was das Wahrscheinlichere ist, der verschiedenen Giftstoffe ermöglichen ließe, die in der Lipoidemulsion enthalten sind. Es wurden auch Versuche nach dieser Richtung angestellt, die aber noch nicht zum Abschluß gekommen sind. An dieser Stelle sollen nur einige Eigenschaften des nach dem Verfahren von Bang und Forssman erhaltenen

Ätherextraktes besprochen werden. Vorerst drängte sich die Frage auf, ob das hellgelbliche fettige Substanzgemenge, das bei der Extraktion der roten Blutkörperchen gewonnen wurde, nicht ausschließlich bei Anwendung gewöhnlichen wasserhaltigen Äthers, sondern auch bei der Extraktion mit völlig wasserfrei gemachtem Äther zu erhalten sei. Um dies zu entscheiden, wurde eine größere Menge Äther (etwa 2 Liter) mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen, um etwa vorhandenen Alkohol zu entfernen; danach die Ätherschicht vom Wasser getrennt und 10 Tage über fein geschnittenem Natrium unter Chlorcalciumabschluß getrocknet. Der so bereitete Äther wurde dann zur Extraktion verwandt und zwar wurden getrocknete Kaninchenblutkörperchen damit ausgeschüttelt und Rinderblutkörperchen im Soxhletapparate extrahiert. Den Versuch am Hunde mit Kaninchenlipoiden gibt folgendes Versuchsprotokoll wieder:

Versuch XX.

100 ccm Kaninchenblut wurden defibriniert und sechsmal mit 0,85 proz. Kochsalzlösung gewaschen; zuletzt scharf zentrifugiert, bis nur eine kleine Volummenge Blutkörperchen übrig blieb. Dieselbe wurde im Vakuum bei 30° getrocknet und die so erhaltene braunschwarze Masse fein gepulvert, danach in üblicher Weise mit dem wasserfreien Äther auf dem Schüttelapparate extrahiert. Nach Einengung der Äthermenge bis auf etwa 3 ccm und Zusatz von 2 ccm absoluten Alkohols wurde mit etwa 22 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung eine trüb-milchige Emulsion erhalten und einem Hunde von 3000 g in 1 Minute in die Vena jugularis injiziert. Der Blutdruck wurde in der Carotis gemessen. Nach der Injektion sank der Blutdruck von 134 mm Hg auf 80 mm Hg, das Tier war völlig schlaff gelähmt, die Atmung und der Puls beschleunigt. Nach kurzer Zeit erholte sich das Tier wieder, auch der Blutdruck stieg wieder an. Das Tier ward verblutet.

Das durch Injektion der mit wasserfreiem Äther extrahierten Kaninchenlipoide am Hunde erzeugte Vergiftungsbild unterschied sich also durch nichts von dem früher beschriebenen, das durch Injektion von Lipoiden, die mit gewöhnlichem Äther extrahiert worden waren, hervorgerufen war. Ebenso verliefen die anderen am Hunde angestellten Versuche mit durch wasserfreien Äther extrahierten Kaninchenlipoiden. Es kann deshalb keinem Zweifel unterliegen, daß die giftig wirkenden Substanzen der roten Blutkörperchen in wasserfreiem Äther löslich sind.

Es mögen hier noch zwei Versuche Erwähnung finden, die über die Löslichkeit der Giftsubstanzen im Alkohol und in Chloroform Aufschluß geben sollten; als geeignetstes Objekt wurden wieder Kaninchenlipoide am Hunde geprüft und wie folgt verfahren.

Versuch XXI.

85 ccm defibrinierten Kaninchenblutes wurden wie gewöhnlich mit Äther extrahiert und nach Einengung des Äthers bis auf etwa 2 ccm 20 ccm absoluten Alkohols zugesetzt. Der hierbei entstehende dicke Niederschlag wurde sorgfältig abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbade bis auf 2 ccm eingedampft, hierauf mit Zusatz von 22 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung eine Emulsion bereitet und einem Hunde von 8000 g (6,10 pro Kilogramm) in einer Minute injiziert. Der Blutdruck sank nach der Injektion von 171 mm Hg auf 162 mm Hg. Sonstige Erscheinungen traten nicht ein. Dem gleichen Tiere wurde 22 Minuten nachher eine zweite Emulsion injiziert, die ebenfalls aus 85 ccm Ätherextrakt aus Kaninchenblutkörperchen bereitet war; nach Einengung des Äthers auf etwa 2 ccm wurden 20 ccm Chloroform zugesetzt und der entstandene feine Niederschlag durch glattes Filterpapier abfiltriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade bis auf 2 ccm etwa eingedampft und unter Zusatz von 2 ccm Alkohol mit 20 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung aufgenommen. Die so entstandene Emulsion wurde ebenfalls intravenös injiziert; der Blutdruck sank nach der Injektion von 167 mm Hg auf 127 mm Hg; sonstige Erscheinungen traten jedoch nicht ein. Nach wenigen Minuten stieg der Blutdruck wieder an; das Tier blieb am Leben.

Es scheint demnach, daß die Kaninchenlipoide weder in Alkohol noch in Chloroform löslich sind. Wahrscheinlich stellen sie den weißen Niederschlag dar, der bei dem Zusatze von Alkohol bzw. Chloroform zu dem Ätherrückstand ausfiel. Daraus würde sich auch die Beobachtung erklären, daß die nach der Entfernung der Niederschläge entstehende Emulsion nicht sehr trübe ist. Ob sich die Lipoidsubstanzen aus den Niederschlägen wieder in Lösung bringen lassen, und danach die typischen Erscheinungen bei intravenöser Injektion hervorrufen, bedürfte noch genauerer Untersuchung.

Um die Löslichkeitsverhältnisse der giftigen Substanz zu charakterisieren und die Bezeichnung „Lipoide“ zu rechtfertigen, wurde mit Rücksicht auf das von Hans Meyer und Overton für die Narkotika aufgestellte Gesetz auch die Fettlöslichkeit der giftigen Substanz geprüft. Zu diesem Zwecke mußte zunächst festgestellt werden, ob aus Olivenöl, das nach der Angabe von Hammarsten säurefrei gemacht worden war, Stoffe in Kochsalzlösung übergehen können, welche den Blutdruck des Kaninchens verändern. Wie zu erwarten war, fiel ein derartiger Versuch völlig negativ aus. Ein Kaninchen von 1100 g vertrug sehr gut eine intravenöse Injektion von 50 ccm Kochsalzlösung, die zuvor 2 Stunden lang mit Olivenöl geschüttelt und durch Zentrifugieren vom Öl wieder vollständig getrennt worden war. Nachdem somit die Methodik keine Schwierigkeiten mehr bot, wurden folgende Versuche angestellt.

Versuch XXII.

200 ccm Rinderlipoide, die durch Extraktion mittels des Soxhletapparates gewonnen waren und von denen 14 ccm genügten, um ein Kaninchen von 1000 g fast sofort zu töten (12,7 pro Kilogramm), wurden bis auf etwa 5 ccm eingedampft und mit 2 ccm Alkohol versetzt, hernach mit Kochsalzlösung auf 100 ccm gebracht, wobei eine ziemlich trübe Emulsion entstand. Dieselbe wurde mit 100 ccm des zuvor geprüften Olivenöls 2 Stunden auf dem Schüttelapparate geschüttelt und dann die wässerige Schicht von der öligen durch Zentrifugieren getrennt. Die wässerige Emulsion, die viel weniger trübe war, als die ursprüngliche Kochsalzemulsion vor der Ausschüttelung, wurde dann einem Kaninchen von 1250 g intravenös in 3 Minuten injiziert. Das Tier verhielt sich dabei ganz ruhig, bot keinerlei Schmerzäußerungen dar. Erst nachdem 40 ccm entsprechend 80 ccm Rinderblut (63,2 pro Kilogramm) injiziert worden waren, wurde das Tier dyspnoisch. Allmählich sistierte die Atmung und der Blutdruck sank von 62 mm Hg zur Abszisse. Tod des Tieres 5 Minuten nach Beginn der Injektion.

Versuch XXIII.

Kaninchen, 1000 g, erhält in 1 Minute 15 ccm Rinderlipoide, entsprechend 30 ccm Rinderblut (30 pro Kilogramm) intravenös injiziert, die genau wie in Versuch XXII mit Olivenöl zuvor ausgeschüttelt worden waren. Der Blutdruck stieg nach der Injektion von 100 auf 103 mm Hg. Tier 15 Minuten nach Beginn der Injektion völlig unverändert, zeigt keine Spur von Narkose.

Während von den verwendeten Rinderlipoiden 12,7 pro Kilogramm den sofortigen Tod des Tieres herbeiführten, gelang es somit, durch vorheriges Ausschütteln mit Olivenöl die Emulsion fast völlig zu entgiften; 30,0 pro Kilogramm wurden ohne erkennbare Schädigung vertragen und der sonst beobachtete Vergiftungszustand trat erst ein, als etwa das Fünffache (63,2 pro Kilogramm) der tödlichen Dosis injiziert worden war. Es ist also möglich, **die Giftigkeit der Lipoidemulsion durch Ausschüttelung mit Olivenöl stark herabzusetzen** infolge der Fettlöslichkeit der giftigen Lipoidsubstanz, deren Affinität zum verwendeten Olivenöl offenbar sehr viel größer ist als zu der physiologischen Kochsalzlösung. Die Lipoidsubstanzen stimmen somit in bezug auf ihren Teilungskoeffizienten mit dem von Hans Meyer und Overton für die indifferenten Narkotika festgestellten Verhalten überein.

Wie schon mehrfach erwähnt, wurde die Ätherausschüttelung nach der von Bang und Forssman angegebenen Methode in der Kälte vorgenommen, und bei der Extraktion mit wasserfreiem Äther wurde das zur Verwendung kommende Blut bei einer 30° nicht übersteigenden Temperatur im Vakuum getrocknet. Es geschah dies in erster Linie deshalb, weil mit der Möglichkeit ge-

rechnet werden mußte, daß es sich um Substanzen handle, die höhere Hitzegrade und länger andauernde Hitzeeinwirkung nicht vertrügen. Zur genaueren Orientierung wurden jedoch Lipoidemulsionen, deren Wirkung zuvor bekannt war, auf ihre Wärmeempfindlichkeit geprüft, worüber die folgenden Versuche Aufschluß geben.

Versuch XXIV.

Kaninchen, 1750 g, erhält in 1 Minute 18 ccm Schweinelipoide, die ½ Stunde im Wasserbade bei 70° erhitzt worden war, entsprechend 36 ccm Schweineblut (20,5 pro Kilogramm) intravenös injiziert. Der Blutdruck sank sofort von 61 mm Hg zur Abszisse. Tod des Tieres.

Versuch XXV.

Ein kleiner Hund von 1700 g erhält in ½ Minute 5 ccm Kaninchenlipoidemulsion, die 2 Stunden bei 60° auf dem Wasserbade erhitzt worden war, entsprechend 10 ccm Kaninchenblut (2,8 pro Kilogramm) intravenös injiziert. Der Blutdruck sank von 68 mm Hg auf 62 mm Hg. 20 Minuten nach vollendeter Injektion erneute Injektion von weiteren 5 ccm Kaninchenlipoiden, die in gleicher Weise präpariert worden waren, in ebenfalls ½ Minute. Der Blutdruck sank von 38 mm Hg auf 12 mm Hg. Das Tier ist völlig narkotisiert und schlaff gelähmt; Cornealreflexe erhalten; erholt sich langsam wieder; bleibt am Leben.

Die Möglichkeit, die Lipoidemulsion auf ihre Kochbeständigkeit zu prüfen, war dadurch erschwert, daß bei längerer Einwirkung der Siedehitze große Flocken ausfielen, die vor der Transfusion entfernt werden mußten, um Thrombosen und Embolien zu vermeiden. Kurzdauernde Einwirkung von Siedetemperatur wurde dagegen vertragen und die Lipoidemulsion war in gleicher Weise wirksam wie nach längerer Einwirkung von Temperaturen von 60 und 70°, die, wie aus den Versuchen XXIV und XXV hervorgeht, die Giftigkeit in keiner Weise herabsetzen. Auch beeinflusst die Extraktion mit siedendem Äther im Soxhletapparate, wie sie zur Darstellung der Rinderlipoide in Anwendung kam, die Wirksamkeit der Emulsion in keiner Weise. Es handelt sich hier also offenbar um Substanzen, die in hohem Grade thermostabil sind.

Die Untersuchung der Lipoide der roten Blutkörperchen fand in erster Linie statt, um ihre Beteiligung bei den Transfusionswirkungen artfremden und artgleichen Blutes klarzustellen; es ist jedoch anzunehmen, speziell mit Rücksicht auf die ganz ähnlichen Wirkungen, welche artfremdes Zellmaterial, in den Kreislauf gebracht, hervorruft, daß die gleichen oder ähnliche Substanzen

überall im Organismus vorkommen, und daß zahlreiche, bisher nicht genauer bekannte Vorgänge bei der Einführung artfremden Zellmaterials zum Teil wenigstens auf einer Mitbeteiligung der betreffenden Lipoidsubstanzen beruhen. Es bedarf jedoch erst einer genaueren Kenntnis der in den verschiedenen Zellen des Organismus vorkommenden Lipoidsubstanzen, um eine derartige Fragestellung zu ermöglichen.

Schlußsätze.

1. Die intravenöse Injektion von Lipoidsubstanzen artfremder roter Blutkörperchen ruft beim Hunde, bei der Katze und beim Kaninchen ein Vergiftungsbild hervor, das sich durch Blutdrucksenkung, Atmungs- und Pulsbeschleunigung, Erscheinungen von Lähmung und Narkose kennzeichnet.

2. Die Lipoidsubstanzen der artgleichen roten Blutkörperchen sind für den Hund und das Kaninchen in der Regel ungiftig, für die Katze zwar giftig, jedoch erst in viel größerer Menge als die artfremden Lipoidsubstanzen.

3. Die giftig wirkenden Lipoidsubstanzen sind in wasserfreiem Äther löslich, in Alkohol und Chloroform unlöslich.

4. Die Lipoidsubstanzen lassen sich aus einer Kochsalzemulsion durch Schütteln mit Olivenöl größtenteils entfernen.

5. Die Lipoidsubstanzen sind, mit Kochsalzlösung zu einer Emulsion gebracht, thermostabil.

XIX.

Zur Kenntnis des Lysinogens der Blutscheiben.

Von Dr. **Kenji Takaki** (Tokio, Japan).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Für die wissenschaftliche Kenntnis der Vorgänge, die zur Bildung der Hämolysine im Tierkörper führen, ist eine nähere Kenntnis der chemischen Natur des Lysinogens, d. h. jenes Bestandteiles der Blutscheiben, der die Hämolysinbildung auslöst, von besonderer Wichtigkeit. Vor kurzem haben nun Bang und Forssman eine ergebnisreiche Arbeit über die Natur der hämolysinogenen Substanz der roten Blutkörperchen veröffentlicht, deren Ergebnisse wörtlich lauten:

„Durch Extraktion der Blutkörperchen oder der Stromata mit Äther läßt sich eine Substanz ausziehen, die bei Injektion in den Versuchstieren Hämolysinbildung bewirkt. Der Immunkörper, den man hierdurch erhält, ist mit dem identisch, den man durch Injektion von Blutkörperchen erhält.

Die lysinogene Substanz verträgt in Kochsalzlösung suspendiert Siedetemperatur durch 1 bis 2 Minuten (vielleicht auch länger, was wir jedoch nicht untersucht haben), ist also kochbeständig. Sie verträgt auch kurzes, $^1/_2$ Minute dauerndes, Kochen in einem alkalischen und salzsauren Medium. Sie ist in Äther, Aceton, kaltem und heißem Alkohol verschiedener Konzentration und in Essigäther unlöslich, während sie von kochendem Benzol gelöst wird und darin auch nach dem Abkühlen gelöst bleibt. Daß sie trotz der Unlöslichkeit in reinem Äther in das erste Ätherextrakt übergeht, läßt sich aus der Gegenwart acetonlöslicher Körper erklären, welche ihre Ätherlöslichkeit vermitteln. Auf Grund ihrer chemischen Reaktionen läßt sich mit Sicherheit sagen, daß sie nicht Fett oder Cholesterin oder ein Eiweißkörper ist; ebensowenig

ist sie nach ihren chemischen Eigenschaften unter die bis jetzt bekannten Phosphatide oder Cerebroside einzureihen.“

Letzterer Ausspruch gründet sich auf die von den Autoren untersuchten Löslichkeitsverhältnisse der lysinogenen Substanz, nicht etwa auf analytische Befunde.

Die Beobachtung, daß die lysinogene Substanz sich aus feuchten Blutkörperchen durch Äther extrahieren läßt, wurde bereits von Landsteiner und Dautwitz bestätigt. Doch ist gegen die Beweiskraft dieser Beobachtung der Einwand erhoben worden, es sei nicht ausgeschlossen, daß die Ätherlöslichkeit des Lysinogens nur durch Beimengung von Wasser oder nicht sichtbarer und nicht abfiltrierbarer kleinster Mengen von Blut und Blutbestandteilen bedingt sein könnte, zumal die erzielte Hämolysinbildung stets nur eine sehr geringe war. Dieser Einwand verliert allerdings im Hinblick auf die von Bang und Forssman ausgeführte oftmalige Extraktion und Filtration stark an Gewicht, zumal sich damit die beobachtete Löslichkeit des Lysinogens in heißem, und Unlöslichkeit in kaltem Benzol schwer vereinigen läßt. Jedenfalls war es von großem Interesse, auf dem von Bang und Forssman gewiesenen Wege der Natur der fraglichen Substanz nachzugehen. Ich folgte daher gern der Aufforderung von Herrn Prof. Hofmeister, sie besser zu charakterisieren und ihre Natur womöglich durch Analyse festzustellen.

Die nächste Aufgabe war, zu ermitteln, wie man möglichst große Menge von Lysinogen am bequemsten extrahiert. Zu diesem Zwecke habe ich als Ausgangsmaterial trockene Blutkörperchen benutzt, obgleich Bang und Forssman frisches Material vorziehen. Das verwendete Pferdeblut war gleich nach dem Tode entnommen.

Die Blutkörperchen wurden durch Zentrifugieren von Serum befreit, zweimal mit 0,9 proz. Kochsalzlösung gewaschen; von der Kochsalzlösung durch Zentrifugieren getrennt, auf Glasplatten in dünner Schicht bei 37° getrocknet, die trockene Masse dann in einer Pulvermühle pulverisiert. Das erhaltene Blutkörperchenpulver ging ohne Schwierigkeit durch ein feines Pferdehaarsieb und war für die Extraktion sehr geeignet. Es wurde in einem selbsttätigen großen Extraktionsapparate mit kochendem Benzol extrahiert. Etwa 1,200 g Blutpulver wurden mit stets erneuten Portionen (von drei bis vier Liter) Benzol und zwar jedesmal etwa 20 Stunden extrahiert. Je nach der Versuchsanordnung wurde

die Extraktion mit immer gewechseltem Benzol bis zu 120 Stunden fortgesetzt.

Das Benzolextrakt war bernsteingelb bis braun gefärbt und klar; es wurde durch ein dickes Filterpapier filtriert, über Nacht stehen gelassen und dann nochmals filtriert. Dann wurde das Benzol bis auf ein kleines Volum abdestilliert, der flüssige Rückstand durch ein gehärtetes Filter filtriert, bei 37° verdunstet und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Der Rückstand dieses Extraktes war schwarzbraun gefärbt und seine Beschaffenheit wechselte je nach der Periode der Extraktion. Die ersten Extrakte setzten einen ziemlich festen Rückstand ab, die Rückstände späterer Extrakte waren mehr ölig.

Zu den Injektionsversuchen wurden die von Lösungsmitteln befreiten Rückstände in bestimmter Menge mit 10 bis 20 ccm 0,9 proz. Kochsalzlösung und 0,1 proz. Natriumcarbonatlösung in einer Reibschale emulgiert und den Versuchstieren — Kaninchen — intraperitoneal eingespritzt. Am achten Tage nach der Injektion wurde das Serum auf seine hämolytische Wirkung untersucht.

Zum Nachweis der erzielten hämolytischen Wirkung wurden in allen Versuchen 2 ccm einer 5 proz. Aufschwemmung von dreimal mit 0,9 proz. Kochsalzlösung gewaschenen Pferdeblutkörperchen in der gleichen Kochsalzlösung benutzt. Behufs annähernder quantitativer Bestimmung bediente ich mich zweier Verfahren.

I. Die Mischung des Serums mit der Blutkörperchenaufschwemmung wurde nach 2 stündigem Stehen bei 37° schnell von den Blutkörperchen durch Zentrifugieren getrennt und der Farbenton der klaren Flüssigkeit in kleinen, stets gleich weiten Reagenzgläschen im gelben Gaslicht gegen einen weißen Hintergrund mit dem Rubinglas des Fleischlschen Hämometers verglichen. Die Flüssigkeit wurde, wenn nötig, verdünnt. Die Skaleneinteilung, die mit dem Rubinglas verbunden ist, gestattete die Farbenintensität der Lösung bequem zahlenmäßig festzustellen. Diese Methode läßt, wenn man für den Vergleich die günstigsten Bedingungen wählt (namentlich bei Betrachtung durch einen schmalen Schlitz), eine ziemlich genaue, für den vorliegenden Zweck genügende Bestimmung zu.

II. Die Serumblutkörperchenmischung wurde nach einstündigem Stehen bei 37° C, 24 Stunden im Eisschrank absitzen gelassen, dann wurde die überstehende Flüssigkeit von den abgesetzten Blutkörperchen durch Abgießen getrennt und in kleinen Reagenzgläschen wie oben mit der Fleischlschen Farbenskala verglichen.

Ich halte nach meinen Erfahrungen das erstangeführte Verfahren für zuverlässiger und habe davon in allen anzuführenden Versuchen, wo nichts anderes bemerkt ist, Gebrauch gemacht.

Zum Vergleich sei zunächst folgendes über die hämolytische Wirkung des Kaninchenserums bemerkt.

Das normale Kaninchenserum wirkt nur schwach hämolytisch auf Pferdeblutkörperchen. Die folgende Tabelle zeigt bei A die höchsten und bei B die niedrigsten hämolytischen Werte, welche ich in zahlreichen Kontrollversuchen, die zu den Versuchen mit Immunserum als Kontrolle angestellt wurden, nach Verfahren I beobachtete. Die Zahlen bedeuten, wie in den später anzuführenden Protokollen, Skalenteile des Hämometers für unverdünntes Serum.

A. Norm. Kaninchenserum	5 Tropfen	+ 2 ccm	Pferdeblutaufschwemmung	=	70
Dasselbe	10 „	+ 2 „	„	=	120
B. Dasselbe	5 „	+ 2 „	„	=	35
Dasselbe	10 „	+ 2 „	„	=	50

Die Zahlen bei A sind ungewöhnlich hoch und sind nur einmal beobachtet; gewöhnlich schwankten die Zahlen zwischen 35 bis 50 für 5 Tropfen und 50 bis 80 für 10 Tropfen.

Das Verfahren II gibt durchweg höhere Werte und zwar auch für die normale Hämolyse, z. B. für 5 Tropfen Serum auf 2 ccm Pferdeblut 110, für 10 Tropfen 160 Skalenteile.

I. Einfluß der Dauer der Benzolextraktion auf die Wirksamkeit der Extrakte.

Die Rückstände der verschiedenen Benzolextrakte zeigten je nach der Periode der Extraktion verschiedene hämolysinbildende Wirkung. Das erste Extrakt wirkt am stärksten. Die späteren Extrakte nehmen an Wirksamkeit mit der Dauer der Extraktion rasch ab. Um diesen Punkt klar zu stellen, habe ich Blutkörperchen mit Benzol durch 160 Stunden extrahiert und die Wirksamkeit für die verschiedenen Extraktperioden festgestellt. Die Resultate sind aus folgenden Versuchen zu ersehen.

Versuch I.

Im ganzen erhielten sechs Kaninchen (Nr. 78, 79, 82, 84, 85, 86) je 0,1 g des Benzolextraktes, gewonnen in den Extraktionsperioden von der 1. bis 30., 30. bis 68., 68. bis 91., 91. bis 112., 112. bis 136. und 136. bis 160. Stunde, intraperitoneal. Die zugehörigen Sera ergaben folgende Werte:

Nr. 78	Serum	5	Tropfen	+ 2 ccm	Pferdeblutaufschwemmung	=	130
	„	10	„	+ 2 „	„	=	345
Nr. 79	„	5	„	+ 2 „	„	=	100
	„	10	„	+ 2 „	„	=	200
Nr. 82	„	5	„	+ 2 „	„	=	90
	„	10	„	+ 2 „	„	=	130
Nr. 84	„	5	„	+ 2 „	„	=	70
	„	10	„	+ 2 „	„	=	85
Nr. 85	„	5	„	+ 2 „	„	=	25
	„	10	„	+ 2 „	„	=	65

Nr. 86	Serum 5 Tropfen	+ 2 ccm	Pferdeblutaufschwemmung	= 20
	„ 10 „	+ 2 „	„	= 40
Normales Kaninchenserum	5 „	+ 2 „	„	= 50
	10 „	+ 2 „	„	= 75

Man sieht sehr deutlich, daß nur die ersten drei bis vier Extrakte wirksam sind, die späteren nicht mehr. Die Erscheinung kann dahin gedeutet werden, daß die lysinogene Substanz in ziemlich kurzer Zeit, ungefähr in 100 Stunden, aus den Blutkörperchen vollständig extrahiert wird, oder aber, daß sie durch das lange Erhitzen verändert und zwar entweder unwirksam oder in kochendem Benzol unlöslich wird, oder endlich, daß ihre anfängliche Extrahierbarkeit durch die Anwesenheit von anderen Blutkörperchenbestandteilen bedingt ist.

Die erste Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, weil sich herausstellte, daß das Blutkörperchenpulver, welches 160 Stunden mit kochendem Benzol extrahiert worden war, noch die Fähigkeit besaß, Hämolysinbildung zu veranlassen. In bezug auf die zweite Möglichkeit ist die folgende Tatsache zu berücksichtigen. Der unten folgende Versuch V zeigt zwar, daß die lysinogene Substanz durch langes Kochen mit Benzol an Wirksamkeit verliert, daß aber dabei, wie aus der Wirksamkeit des extrahierten Blutkörperchenpulvers hervorgeht, die lysinogene Substanz nur zum Teil in die unwirksame Form umgewandelt wird.

Die dritte Möglichkeit scheint mir am wahrscheinlichsten. Es ist durch die Untersuchungen von Thudichum, Bang und Forssman, Erlandsen usw. bekannt, daß die verschiedenen „Lipoide" in ihrer Löslichkeit durch die Anwesenheit anderer Substanzen in höchstem Grade beeinflußt werden. Es ist danach von vornherein wahrscheinlich, daß die lysinogene Substanz anfangs in Gegenwart von anderen benzollöslichen Bestandteilen in Benzol übergeht, aber später, wenn diese Substanzen bereits ausgezogen sind, nicht mehr. Außerdem ist möglich, daß die lysinogene Substanz in Abwesenheit von anderen benzollöslichen Blutkörperchenbestandteilen in irgend einer Weise fixiert wird, die die Extraktion hemmt.

In der Tat, wenn man nach Pascucci dargestellte Stromata statt des Blutkörperchenpulvers mit kochendem Benzol extrahiert, ist das Wirksamkeitsverhältnis ein anderes, und die späteren Extrakte sind noch ziemlich wirksam.

Versuch II.

4 g Stromata, nach Pascucci dargestellt, wurden 206 Stunden mit kochendem Benzol extrahiert und die Extrakte von verschiedenen Perioden der Extraktion auf ihre Wirkung untersucht.

Kaninchen	Nr. 105	erhält das	halbe	Benzolextrakt	von der	1.—18.	Stde.
„	„ 107	„ „	ganze	„	„ „	106.—130.	„
„	„ 109	„ „	„	„	„ „	130.—150.	„
„	„ 117	„ „	„	„	„ „	150.—206.	„

Serum Nr. 105	5 Tropfen	+ 2 ccm	Pferdeblut	=	160
	10 „	+ 2 „	„	=	600
„ „ 107	5 „	+ 2 „	„	=	65
	10 „	+ 2 „	„	=	280
„ „ 109	5 „	+ 2 „	„	=	50
	10 „	+ 2 „	„	=	120
„ „ 117	5 „	+ 2 „	„	=	30
	10 „	+ 2 „	„	=	90
Normales Kaninchenserum	5 „	+ 2 „	„	=	50
	10 „	+ 2 „	„	=	80

Dieser Unterschied in der Extrahierbarkeit des Lysinogens aus dem Blutkörperchenpulver und den Stromata beruht vielleicht auf der Anwesenheit von Hämoglobin und anderen Blutkörperchenbestandteilen.

Bemerkenswert ist, daß die 206 stündige Benzolbehandlung die Wirksamkeit der Stromata zwar herabgesetzt, aber nicht vernichtet hatte.

Versuch III.

Kaninchen Nr. 104 erhält 0,1 g Pascuccische Stromata intraperitoneal. Kaninchen Nr. 121 erhält 0,1 g 206 Stunden extrahierte Stromata intraperitoneal.

Serum Nr. 104	5 Tropfen	+ 2 ccm	Pferdeblut	=	140
	10 „	+ 2 „	„	=	540
„ „ 121	5 „	+ 2 „	„	=	100
	10 „	+ 2 „	„	=	300

II. Fraktionierung des Benzolextraktes.

Zur weiteren Reinigung des Lysinogens habe ich zunächst nach dem Vorgehen von Bang und Forssman Aceton benutzt. Nach diesen Autoren ist die lysinogene Substanz in kaltem Aceton unlöslich. Zur Extraktion wurde das Benzolextrakt des Blutkörperchenpulvers in einem kleinen Rundkolben mit kochendem Aceton unter öfterem Wechseln des Acetons erschöpft, bis das Aceton beinahe farblos blieb. Das Wechseln des Acetons geschah immer durch Dekantieren (nicht Filtrieren). Die acetonlösliche Fraktion enthielt kein Lysinogen, wohl aber die acetonunlösliche.

Die wirksame acetonunlösliche Fraktion des Benzolextraktes wurde nach Verdunsten des Acetons mit kaltem Äther erschöpft, bis nichts mehr überging.

Das Lysinogen blieb im ätherunlöslichen Teile zurück. Dieser wurde mit kochendem absoluten Alkohol erschöpft, wobei nur eine sehr kleine Menge Substanz in den Alkohol überging. Die ungelöst gebliebene Fraktion enthielt allein die lysinogene Substanz. Sie stellte ein braunes Pulver dar und war viel wirksamer als das ursprüngliche Benzolextrakt. Sie sei der Kürze wegen als „Rohlysinogen" bezeichnet. Die Elementaranalyse verschiedener Proben des Rohlysinogens hat zwar, wie später erwähnt werden soll, verschiedene Zahlen ergeben, aber wir können doch annehmen, daß dieses Produkt das reine Lysinogen in größerer Menge enthält, zumal da es beinahe frei von Eiweiß ist, welches ja ungefähr 70 Proz. der Stromata ausmacht.

Zur besseren Übersicht füge ich die Skizze des Extraktionsvorganges bei.

Benzolextrakt + kochendes Aceton
- löslicher Teil (unwirksam)
- unlöslicher Teil + kalter Äther
  - unlösl. Teil + koch. abs. Alkohol
    - unlöslicher Teil (= Rohlysinogen)
    - löslicher Teil (unwirksam)
  - löslicher Teil (unwirksam)

III. Wirksamkeit des Rohlysinogens.

Die Wirksamkeit des Rohlysinogens im Vergleich mit dem ursprünglichen Benzolextrakt ist aus den folgenden Versuchen zu ersehen.

Versuch IV.

Die hämolytischen Sera Nr. 3 und 5 sind nach Injektion von 0,04 g Benzolextrakt der Blutkörperchen gewonnen, die Sera Nr. 8 und 9 nach Injektion von 0,02 g Rohlysinogen.

Der Grad der Hämolyse in diesen Versuchen ist nach Verfahren II bestimmt.

Serum	Tropfen		Pferdeblut	Grad
Serum Nr. 3	5 Tropfen	+ 2 ccm	Pferdeblut	= 200
	10 „	+ 2 „	„	= 370
„ „ 5	5 „	+ 2 „	„	= 180
	10 „	+ 2 „	„	= 420
„ „ 8	5 „	+ 2 „	„	= 360
	10 „	+ 2 „	„	= 550
„ „ 9	5 „	+ 2 „	„	= 420
	10 „	+ 2 „	„	= 760
Normales Kaninchenserum	5 „	+ 2 „	„	= 110
	10 „	+ 2 „	„	= 160

Es ist bemerkenswert, daß die immunisierende Wirkung des Rohlysinogens nicht viel größer ist als die des ursprünglichen

Benzolextraktes, namentlich wenn man berücksichtigt, daß man aus 4 bis 5 g Benzolextrakt nur einige Centigramme Rohlysinogen erhält. Die wahrscheinlichste Erklärung davon dürfte sein, daß das Rohlysinogen bei den chemischen Manipulationen allmählich an Wirksamkeit verliert, d. h. in eine nicht mehr wirksame Substanz übergeht. Diese Annahme wird durch die folgenden Versuche unterstützt.

Proben des Benzolextraktes, dessen Wirksamkeit vorher bestimmt war, wurden nebeneinander mit kochendem Aceton, absolutem Alkohol und Benzol, sowie mit kaltem Äther 50 Stunden lang behandelt und je 0,1 g des Rückstandes den Versuchstieren intraperitoneal beigebracht.

Versuch V.

Kaninchen	Nr. 78	erhält	0,1 g	Benzolextrakt A
	„ 118	„	0,1 „	„ B
	„ 87	„	0,1 „	mit kochendem Benzol 50 Std. behand. Benzolextrakt A
	„ 89	„	0,1 „	„ kaltem Äther 50 „ „ „ A
	„ 119	„	0,1 „	„ koch. Aceton 50 „ „ „ B
	„ 120	„	0,1 „	„ koch. abs. Alkohol 50 „ „ „ B

Die Sera zeigten nachstehende Wirksamkeit:

Serum	Tropfen		Pferdeblut	
Serum Nr. 78	5 Tropfen	+ 2 ccm	Pferdeblut	= 130
	10 „	+ 2 „	„	= 345
„ „ 118	5 „	+ 2 „	„	= 100
	10 „	+ 2 „	„	= 480
„ „ 87	5 „	+ 2 „	„	= 20
	10 „	+ 2 „	„	= 40
„ „ 89	5 „	+ 2 „	„	= 35
	10 „	+ 2 „	„	= 85
„ „ 119	5 „	+ 2 „	„	= 30
	10 „	+ 2 „	„	= 100
„ „ 120	5 „	+ 2 „	„	= 35
	10 „	+ 2 „	„	= 100

Diese Versuche zeigen sehr deutlich, daß längerdauernde Behandlung mit kochendem Benzol, Aceton und absolutem Alkohol, sowie mit kaltem Äther eine starke schädigende Wirkung auf die Wirksamkeit des Lysinogens ausübt. Bei der Darstellung des Rohlysinogens aus dem Benzolextrakt dauerte die Behandlung mit den einzelnen Lösungsmitteln allerdings nie so lange, z. B. die Behandlung mit kochendem Aceton und Alkohol gewöhnlich nicht über 10 Stunden, doch ist eine teilweise Schädigung des Lysinogens sicher anzunehmen.

Wie zu erwarten, wirkt das aus den ersten Benzolextrakten dargestellte Rohlysinogen immer stärker als das aus den späteren gewonnene. Das zeigt folgender Versuch.

Versuch VI.

Es wurden zwei Proben von 0,02 g Rohlysinogen — von denen die erste (A) aus dem Benzolextrakt der ersten 30 Stunden, die zweite (B) aus dem Benzolextrakt von der 30. bis zur 160. Stunde herstammte — den Kaninchen Nr. 93 und 95 injiziert.

Die entsprechenden Sera ergaben:

Serum Nr. 93	5 Tropfen	+ 2 ccm Pferdeblut	=	180
	10 „	+ 2 „ „	=	490
„ „ 95	5 „	+ 2 „ „	=	80
	10 „	+ 2 „ „	=	150
Normales Kaninchenserum	5 „	+ 2 „ „	=	45
	10 „	+ 2 „ „	=	85

IV. Eigenschaften und Zusammensetzung des Rohlysinogens.

Das Rohlysinogen wird als ein braunes Pulver erhalten, dessen Farbe manchmal mehr grau, manchmal mehr dunkelbraun ist.

Es ist in Äther, Chloroform, Essigäther, Petroläther, heißem und kaltem Alkohol, heißem und kaltem Aceton, kaltem Benzol, Xylol und Wasser unlöslich, während es teilweise von kochendem Benzol, ziemlich vollständig von $^1/_4$ n-Natronlauge in der Kälte gelöst wird.

Beim Verbrennen riecht es etwas nach Horn und läßt eine schwer verbrennbare Asche zurück, die Eisen, Phosphorsäure und Schwefelsäure enthält.

Es gibt positive Molischsche Reaktion, spaltet aber beim Sieden mit Salzsäure keine reduzierende Substanz ab. Die Eiweißreaktionen sind negativ.

Auch die Lösung, welche durch einstündiges Schütteln mit $^1/_4$ n-Natronlaugelösung hergestellt wurde, gab keinen Niederschlag mit Phosphorwolframsäure, keine Biuret-, keine Millonsche-, keine Xanthoproteïn-, keine Cystinreaktion, wohl aber eine positive Molischsche Probe. Beim Ansäuern mit Salzsäure gab sie einen Niederschlag, welcher durch Zusatz von überschüssiger Säure wieder gelöst wurde. Auch dieser Niederschlag gab keine Biuret-, keine Millonsche- und auch sonst keine Eiweißreaktion.

Die Analyse gab die folgenden Zahlen.

I. Rohlysinogen, erhalten aus dem Benzolextrakt der ersten 40 Stunden:

0,1200 g Substanz gaben 0,2019 g CO_2 und 0,0724 g H_2O
0,1287 g „ „ 3,80 ccm N bei 19° und 761,8 mm Hg.

Gefunden

C . . . . 45,87 Proz.
H . . . . 6,75 „
N . . . . 3,41 „

II. Rohlysinogen aus dem Benzolextrakt, gewonnen von der 30. bis zur 120. Extraktionsstunde:

0,1136 g Substanz gaben 0,1345 g CO_2 und 0,0527 g H_2O
0,1014 g „ „ 3,78 ccm N bei 22° und 755 mm Hg.

Gefunden

C . . . . 32,28 Proz.
H . . . . 5,19 „
N . . . . 4,68 „

III. Rohlysinogen aus einem Benzolextrakt von der 20. bis zur 120. Extraktionsstunde:

0,1241 g Substanz gaben 3,78 ccm N bei 21,1° und 764,3 mm Hg.

Gefunden

N . . . . 3,50 Proz.

Leider reichten die erhaltenen Mengen stets nur zu den angeführten Analysen, so daß nicht einmal die Aschenbestimmung ausgeführt werden konnte.

Die Aschenbestimmungen von zwei anderen Darstellungen ergaben 34,90 und 35,8 Proz. Asche.

0,0708 g Substanz gaben 0,0247 g Asche = 34,90 Proz.
0,0439 g „ „ 0,0154 g „ = 35,08 „

Es sind sonach auch die analysierten Präparate sicher sehr aschenreich gewesen.

Wie aus den Analysen hervorgeht, ist die Zusammensetzung des Rohlysinogens je nach der Darstellung verschieden. Dieser Umstand, sowie der hohe Aschengehalt, verbieten es, das Lysinogen mit einem bestimmten Bestandteile des Stromas in Beziehung zu bringen. Der Aschengehalt, der vor allem auf Gegenwart von Eisenoxyd beruht, konnte auf Hämatinbeimengung hinweisen. Indes gelang es, in der alkalischen braunen Lösung weder direkt noch nach Reduktion mit Schwefelammonium ein darauf hinweisendes Absorptionsspektrum nachzuweisen. Überdies ergab sich, daß das aus reinen Stromata dargestellte Rohlysinogen keinen nennenswerten Eisengehalt aufwies.

Immerhin läßt sich aus den Reaktionen, dem geringen Stickstoffgehalt und dem Verhältnis von C:N entnehmen, daß die Hauptmasse des Rohlysinogens sicher kein typischer Eiweißkörper ist. Eher ließe sich vermuten, daß darin ein Phosphatid, eventuell, da auch organischer Schwefel vorhanden war, ein Gemenge von

Phosphatid und Sulfatid vorliegt. Die starke Molischsche Probe deutet andererseits auf einen Kohlehydratkomplex hin. Ein Anlaß, im Rohlysinogen die Anwesenheit eines der beschriebenen Phosphatide, oder Cerebroside, oder eines bestimmten Lipoids zu vermuten liegt nicht vor.

Bei der äußerst mühseligen Darstellung und verschwindend geringen Ausbeute erscheint der eingeschlagene Weg für eine Gewinnung des reinen Lysinogens wenig aussichtsvoll, namentlich wenn man sich vor Augen hält, daß keine Gewähr dafür vorhanden ist, daß das Rohlysinogen auch nur der Hauptmenge nach aus dem eigentlichen Lysinogen besteht.

V. Nachweis der Wasserlöslichkeit des Lysinogens.

Wie schon aus den Erfahrungen von Bang und Forssman hervorgeht, wechseln die Lösungsverhältnisse des Lysinogens außerordentlich je nach der Natur der es begleitenden Stoffe. Während es bei direkter Extraktion der Blutscheiben in Äther überging, erwies es sich nach Entfernung der acetonlöslichen Stoffe als ätherunlöslich. Ebenso konnte oben gezeigt werden, daß es bei Behandlung mit heißem Benzol zuerst von diesem aufgenommen wurde, später aber nicht mehr. Es gelten daher alle Beobachtungen über die Löslichkeitsverhältnisse des Lysinogens streng genommen nur für ganz bestimmte Bedingungen.

Es ist daher nicht überraschend, daß sich bei weiteren Versuchen mit Rohlysinogen die Wasserlöslichkeit des physiologisch wirksamen Gemengteiles, des eigentlichen Lysinogens, herausgestellt hat. Dieser Befund ist von Interesse, weil er auf bisher nicht betretene Wege zur Isolierung des Lysinogens hinweist, weil er ferner die Wirksamkeit desselben im Tierkörper verständlicher erscheinen läßt, als wenn es sich um einen in Wasser gänzlich unlöslichen Körper handelte.

Wurde Rohlysinogen mit $^1/_{10}$ n-Natronlauge eine Stunde lang geschüttelt, dann die abfiltrierte Lösung mit verdünnter Salzsäure genau neutralisiert, so fiel ein bräunlich gefärbter Niederschlag aus, der dem größeren Teile der angewandten Substanz entsprach. Wurden nun alle drei Fraktionen, nämlich ungelöst gebliebener Anteil des Rohlysinogens, Neutralisationsniederschlag und Filtrat, Kaninchen beigebracht, so erwies sich das Filtrat als sehr energisch wirksam, während der Niederschlag jeder Wirkung entbehrte.

Versuch VII.

0,1 g Rohlysinogen wurde mit 40 ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge durch 1 Stunde geschüttelt und weiter, wie oben erwähnt, behandelt. Die ungelöst gebliebene Substanz wurde dem Kaninchen Nr. 99, je eine Hälfte des Neutralisationsniederschlags den Kaninchen Nr. 100 und 101 und je eine Hälfte des Filtrats den Kaninchen Nr. 102 und 103 injiziert.

Die zugehörigen Sera Nr. 99, 100, 101, 102 und 103 zeigten folgendes Verhalten.

Serum		Tropfen		ccm Pferdeblut		
Serum Nr. 99	5	Tropfen	+ 2	ccm Pferdeblut	= 40	Ungelöst gebliebener Teil
	10	„	+ 2	„ „	= 250	
„ „ 100	5	„	+ 2	„ „	= 25	Neutralisations-Niederschlag
	10	„	+ 2	„ „	= 95	
„ „ 101	5	„	+ 2	„ „	= 40	
	10	„	+ 2	„ „	= 80	
„ „ 102	5	„	+ 2	„ „	= 120	Filtrat
	10	„	+ 2	„ „	= 420	
„ „ 103	5	„	+ 2	„ „	= 200	
	10	„	+ 2	„ „	= 450	
Normales Kaninchenserum	5	„	+ 2	„ „	= 50	Kontrolle
	10	„	+ 2	„ „	= 80	

Versuch VIII.

0,1 g Rohlysinogen, wie oben behandelt. Kaninchen Nr. 111 erhält die Hälfte des Filtrats, Kaninchen Nr. 112 die Hälfte des Niederschlags injiziert.

Serum		Tropfen		ccm Pferdeblut	
Serum Nr. 111	5	Tropfen	+ 2	ccm Pferdeblut	= 160
	10	„	+ 2	„ „	= 550
„ „ 112	5	„	+ 2	„ „	= 20
	10	„	+ 2	„ „	= 80

Versuch IX.

0,03 g Rohlysinogen, wie oben behandelt. Kaninchen Nr. 125 erhält das Filtrat, Kaninchen Nr. 126 den Niederschlag injiziert.

Serum		Tropfen		ccm Pferdeblut	
Serum Nr. 125	5	Tropfen	+ 2	ccm Pferdeblut	= 260
	10	„	+ 2	„ „	= 660
„ „ 126	5	„	+ 2	„ „	= 66
	10	„	+ 2	„ „	= 96
Normales Kaninchenserum	5	„	+ 2	„ „	= 50
	10	„	+ 2	„ „	= 80

Wie man sieht, geht die lysinogene Substanz aus dem Rohlysinogen ziemlich leicht in $^1/_{10}$ n-Lauge über und wird aus ihr nicht durch Neutralisation gefällt, ist somit in der verdünnten Kochsalzlösung löslich.

Demgegenüber ist es von Wichtigkeit, daß die direkte Extraktion der Stromata zum entgegengesetzten Resultate führt.

Versuch X.

0,2 g nach Pascucci dargestellter Stromata wurden in 40 ccm $^1/_{10}$ n-Natron gelöst, die Lösung mit Salzsäure neutralisiert, je die Hälfte des Niederschlages den Kaninchen Nr. 116 und 128, je die Hälfte des Filtrats den Kaninchen Nr. 113 und 127 injiziert.

Serum						
Serum Nr. 116	5 Tropfen	+ 2 ccm	Pferdeblut	=	120	Niederschlag
	10 „	+ 2 „	„	=	400	
„ „ 128	5 „	+ 2 „	„	=	110	
	10 „	+ 2 „	„	=	400	
„ „ 113	5 „	+ 2 „	„	=	20	Filtrat
	10 „	+ 2 „	„	=	65	
„ „ 127	5 „	+ 2 „	„	=	50	
	10 „	+ 2 „	„	=	100	
Normales Kaninchenserum	5 „	+ 2 „	„	=	35	Kontrolle
	10 „	+ 2 „	„	=	90	

In diesem Versuche bleibt das Lysinogen bei der Neutralisation in dem vorwiegend aus Eiweißstoffen bestehenden Niederschlage, das Filtrat ist unwirksam. Danach muß man schließen, daß Lysinogen bei Anwesenheit der Stromaeiweißstoffe — vielleicht übrigens auch anderer alkalilöslicher Substanzen — in das Neutralisationspräzipitat eingeht; ob in Form einer lockeren chemischen Bindung oder durch Absorption, entzieht sich der Beurteilung. Es lehrt dieses Verhalten neuerdings, wie wenig man berechtigt ist, aus den zu beobachtenden Lösungsverhältnissen des Lysinogens Schlüsse auf seine chemische Natur zu ziehen.

Es war von Interesse, die chemischen Reaktionen des wässerigen lysinogenhaltigen Filtrats zu prüfen; es ergab sich im ganzen Übereinstimmung mit den beim Rohlysinogen ermittelten. Auch diese Lösung gab trotz großer Verdünnung Molischs Probe; sie zeigte keine der allgemeinen Eiweißreaktionen, auch keine Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure und durch Alkohol. Beim Verdampfen hinterließ das Filtrat einen weißen Rückstand, der viel Kochsalz enthielt. Der Rückstand verkohlte beim Glühen mit Geruch nach verbrennendem Fett und die Kohle gab eine starke Phosphorsäurereaktion mit Molybdänsäure. Auf Schwefel konnte wegen mangels an Material nicht untersucht werden. Die quantitative Bestimmung der organischen Substanzen im Rückstande gab 0,0138 g aus 0,0890 g Rohlysinogen. Mit Rücksicht auf die Intensität der Wirkung darf man sagen, daß die lysinogene Substanz eine äußerst wirksame Substanz sein muß, was mit den Angaben von Friedberger und Dorner[8]) übereinstimmt.

Wie oben gezeigt, liegt keine Tatsache vor, die als Beweis für die Eiweißnatur des Lysinogens angeführt werden könnte, was

mit den Befunden von Bang und Forssman übereinstimmt. Andererseits wird man gut tun, seine Einreihung unter die „Lipoide", deren Begriff allerdings mehr ein physiologischer als ein chemischer ist, nur als vorläufig anzusehen. Sicher ist, daß es überaus leicht sowohl Eiweißkörpern als Lipoiden in Niederschläge bzw. Lösungen zu folgen vermag. Nimmt man an, daß die chemischen Reaktionen der möglichst eiweiß- und lipoidfreien Lysinogenlösung wirklich dem Lysinogen und nicht etwa ihm immer noch anhaftenden Beimengungen zukommen, so muß man ihm einen Gehalt an Phospor und an Kohlehydrat zusprechen. Eine Beziehung zu einem der bekannten Phosphatide ist aber nicht nachweisbar.

Literatur.

[1]) Bordet, Les Sérums hémolytiques etc. Ann. de l'Inst. Pasteur 1900.

[2]) Bang und Forssman, Untersuchungen über die Hämolysinbildung. Diese Beiträge 8, 236 (1906).

[3]) Dautwitz und Landsteiner, Über die Beziehungen der Lipoide zur Serumhämolyse. Diese Beiträge 9, 431 (1907).

[4]) Pascucci, Die Zusammensetzung des Blutscheibenstromas und die Hämolyse. Diese Beiträge 6, 543 (1905).

[5]) Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirns usw. Tübingen 1901.

[6]) Bang, Biochemie der Zellipoide. Ergebnisse der Physiologie 1908.

[7]) Erlandsen, Untersuchungen über die lecithinartigen Substanzen des Myocardiums und der quergestreiften Muskel. Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 71 (1907).

[8]) Friedberger und Dorner, Über die Hämolysinbildung durch Injektion kleinster Mengen von Blutkörperchen und über den Einfluß des Aderlasses auf die Intensität der Bildung hämolytischer Ambozeptoren beim Kaninchen. Zentralbl. f. Bakteriologie 38 (1905).

XX.

Über Tetanusgift bindende Bestandteile des Gehirns.

Von Dr. **Kenji Takaki** (Tokio, Japan).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

1.

Den Ausgangspunkt nachstehender Untersuchungen bildete die bekannte Beobachtung von Wassermann und T. Takaki[1]), der zufolge frische Gehirn- und Rückenmarksemulsion die Fähigkeit besitzt, beim Zusammenbringen mit Tetanusgift nach kurzer Zeit dessen Wirkung aufzuheben. Dönitz[2]) zeigte später, daß diese antitoxische Wirkung vornehmlich der grauen Substanz zukommt. Nach Milchner[15]) geht sie durch Kochen, nach Wolff-Eisner und Rosenbaum[3]) durch Autolyse verloren.

Über die chemische Seite der Frage liegen nur spärliche Untersuchungen vor. Asakawa[16]) fand die giftbindenden Stoffe des Gehirns in Kochsalzlösung mit und ohne Glycerinzusatz, sowie auch in der Gewebsflüssigkeit unlöslich. Ignatowski[4]) gibt an, daß Cholesterin und Lecithin, nicht aber Protagon giftbindende Wirkung besitzen. Im Gegensatze dazu zeigten Landsteiner und Eisler[5]), daß Cholesterin und Lecithin, sowie ätherische oder alkoholische Extrakte des Gehirns allein nur in geringem Maße Tetanustoxin zu neutralisieren vermögen und daß, wenn man die Gehirnemulsion vor der Mischung mit dem Toxin mit Äther behandelt, dann die giftbindende Wirkung der Emulsion viel geringer ist. Sie sprechen die Vermutung aus, daß die eigentümliche Zusammensetzung der Hirnsubstanz aus Verbindungen von Proteïn und Lipoiden für die giftbindende Eigenschaft der Nervensubstanz von wesentlicher Bedeutung sei. Später veröffentlichte Landsteiner[6]) gemeinschaftlich mit A. Botteri eine Untersuchung

„über Verbindungen von Tetanustoxin mit Lipoiden". Er fand das Protagon unter den untersuchten Lipoiden am stärksten wirksam.

Diese Untersuchungen zeigen, daß die Lipoide der Nervensubstanz bei dem Wassermannschen Phänomen eine Rolle spielen können. Auf Veranlassung von Herrn Prof. Hofmeister habe ich versucht, über die chemische Natur der dabei beteiligten Substanzen des Gehirns Näheres zu ermitteln.

Als Ausgangsmaterial habe ich trockenes Gehirnpulver gewählt, weil es sich mit den wichtigsten Lösungsmitteln, wie Äther, Benzol und Alkohol usw., viel schneller und vollständiger ausziehen läßt als frisches Material.

Es wurde zuerst festgestellt, daß das trockene Gehirnpulver noch die giftbindende Wirkung gegen Tetanustoxin besitzt.

Bereitung des Gehirnpulvers: Menschengehirne, welche innerhalb 24 Stunden nach dem Tode entnommen waren, wurden von Häuten und Gefäßen sorgfältig befreit, fein geschnitten und durch ein feines Pferdehaarsieb getrieben. Der entstandene dünne Brei wurde auf Glasplatten in dünner Schicht ausgebreitet, bei 37 bis 40° schnell eingetrocknet und der Rückstand in der Reibschale fein pulverisiert.

Bei den mitzuteilenden Versuchen wurde, wo nichts anderes bemerkt ist, das Hirnpulver oder die aus Gehirn extrahierte Substanz mit 10 ccm Tetanustoxinlösung[1]) gut gemischt, durch eine Stunde bei Zimmertemperatur unter häufigem Umschütteln stehen gelassen, dann so oft filtriert, bis das Filtrat eine klare Flüssigkeit oder eine feine Emulsion bildete. Ebenso wurden die geprüften Hirnstoffe — feste oder ölige Substanzen — mit der Toxinlösung innig verrieben, dann wurde filtriert und durch Tierversuche ermittelt, ob der Toxingehalt der Lösung sich vermindert hatte, und zwar wurden 0,5 ccm des Filtrates Mäusen in der Nähe der Schwanzwurzel unter die Rückenhaut injiziert.

Die umstehende Tabelle zeigt die giftbindende Wirkung des Gehirnpulvers.

In dieser und allen folgenden Tabellen ist in Kol. I die geprüfte Substanz, in Kol. II deren Menge in Grammen, die mit 10 ccm Toxinlösung behandelt wurde, in Kol. III die Zahl der in 10 ccm Toxinlösung enthaltenen letalen Dosen, in Kol. IV das Gewicht Toxin in den injizierten 0,5 ccm der Toxinlösung, in Kol. V das Gewicht der Versuchsmäuse in Grammen, in Kol. VI der Effekt der Injektion von 0,5 ccm der filtrierten Lösung, in Kol. VII die Zeit des Todes in Tagen nach der Injektion angegeben.

---

[1]) Die Toxinlösung wurde aus sporenfreiem, trockenem Tetanusgift hergestellt.

Versuch I.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Kontrollversuch zur Giftauswertung	—	—	0,000 01	$10^1/_2$	Tetanus	3
Desgl.	—	—	0,000 01	15	„	3
„	—	—	0,000 02	18	„	2
„	—	—	0,000 02	19	„	2
Gehirnpulver	0,5	20	0,000 01	$11^1/_2$	leicht. Tetanus	überlebt
„	0,5	20	0,000 01	$14^1/_2$	„ „	„
„	0,5	40	0,000 02	$21^1/_2$	„ „	„
„	0,5	40	0,000 02	13	Tetanus	7

Diese Versuche zeigen, daß 0,5 g trockenes Gehirnpulver mit 20 und 40 letalen Dosen gemischt eine erhebliche Abschwächung der Giftwirkung bedingt.

2. Die toxinbindende Wirkung kommt den Cerebrosiden zu.

Ich versuchte nunmehr durch Fraktionierung der Hirnbestandteile mittels Lösungsmitteln die Natur der wirksamen Stoffe festzustellen. Es ist klar, daß dabei nur jene giftbindenden Bestandteile in Betracht kommen, die dem betreffenden Extraktionsverfahren widerstehen. Die mitgeteilten Versuche haben demgemäß nur auf solche widerstandsfähige Bestandteile Bezug.

Behufs Fraktionierung wurde das Gehirnpulver zunächst mit kaltem Äther, kaltem und heißem Benzol und heißem Alkohol extrahiert.

Nach Verdunsten der Lösungsmittel bilden alle Extrakte eine braune, schmierige Masse und geben mit der Toxinlösung eine

Versuch II.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Kaltes Ätherextrakt . .	0,5	20	0,000 01	17	Tetanus	21
„ „ . .	0,5	20	0,000 01	18	„	19
„ Benzolextrakt. .	0,5	20	0,000 01	$12^1/_2$	„	7
„ „ . .	0,5	20	0,000 01	22	„	7
Heißes „ . .	0,5	20	0,000 01	$22^1/_2$	„	überlebt
„ „ . .	0,5	20	0,000 01	11	„	16
„ Alkoholextrakt .	0,5	20	0,000 01	26	leicht. Tetanus	überlebt
„ „ .	0,5	20	0,000 01	24	„	„
„ „ .	0,5	40	0,000 02	23	Tetanus	14
„ „ .	0,5	40	0,000 02	$25^1/_4$	„	11

Kontrollversuche wie in Versuch I.

milchartige Emulsion. Diese Emulsionen gehen sehr leicht durch Filterpapier und das Filtrat bleibt, trotz mehrmaliger Filtration, trübe. Die Wirksamkeit der verschiedenen Extrakte zeigt vorstehende Tabelle.

Aus diesem Versuche ist zu ersehen, daß alle diese Extrakte, und zwar das kalte Benzolextrakt am schwächsten, das heiße Alkoholextrakt am stärksten, giftbindende Wirkung besitzen. Umgekehrt besitzt das mit heißem Alkohol extrahierte Gehirnpulver nachher die schwächste giftbindende Wirkung, das mit kaltem Benzol extrahierte Hirnpulver die stärkste.

Versuch III.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Mit kaltem Benzol extrahiertes Gehirnpulver .	0,5	20	0,000 01	16	kein Tetanus	überlebt
Desgl.	0,5	20	0,000 01	22	„ „	„
Mit heißem Alkohol extrahiertes Gehirnpulver	0,5	20	0,000 01	$23^1/_2$	Tetanus	8
Desgl.	0,5	20	0,000 01	20	„	5

Kontrollversuch in Versuch I.

Wie man sieht, ist man imstande, dem Gehirnpulver beinahe alle entgiftenden Eigenschaften durch heißen Alkohol zu entziehen.

Die Frage, ob die giftbindende Wirkung des alkoholischen Extraktes der gesamten Wirkung des Gehirnpulvers und der frischen Gehirnemulsion entspricht, wurde nicht untersucht.

Das heiße alkoholische Extrakt setzte beim Abkühlen und Stehen einen weißen Niederschlag — die „weiße Materie“ von Thudichum [8]) — ab. Der Niederschlag wurde abfiltriert und sowohl Niederschlag als auch Filtrat nach dem Trocknen mit Toxinlösung gemischt, das Filtrat den Versuchsmäusen injiziert.

Versuch IV.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Die „weiße Materie“ . .	0,2	20	0,000 01	19	kein Tetanus	überlebt
„ „ „ . .	0,2	20	0,000 01	20	„ „	„
Das Filtrat	0,2	20	0,000 01	$14^1/_2$	Tetanus	4
„ „	0,2	20	0,000 01	$18^1/_2$	„	4

Die heiße alkoholische Lösung läßt sich sonach durch Abkühlen in eine in der Kälte unlösliche wirksame und eine in der Kälte lösliche unwirksame Fraktion trennen. Die wirksame Fraktion — die

„weiße Materie“ — enthält nach Thudichum vor allem Cerebroside, Cerebrinacide, daneben geringere Mengen Kephalin, Lecithin, Paramyelin, Myelin, Cholesterin und Amidolipotide; die unwirksame Fraktion — das Filtrat —, welches die „butterige“ und die „letzte ölige Materie“ absetzt, enthält Cholesterin, Lecithin, Paramyelin, Kephalin, Myelin, Amidomyelin, Amidolipotide und wenig Cerebroside neben anderen an Menge geringfügigen Beimengungen. Die „weiße Materie“ wurde zunächst nach Thudichums[8]) Methode weiter behandelt, und zwar zuerst mit kaltem Äther in einer Flasche durch Schütteln erschöpft. Dabei gehen alle Substanzen, außer den Cerebrosiden, Cerebrinaciden, einem Teile der Amidolipotide, und etwas Phosphatid in Lösung. Wie die folgenden Versuche beweisen, zeigt sich nur die ätherunlösliche Fraktion wirksam.

Versuch V.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Die „weiße Materie“, ätherunlöslicher Teil	0,2	20	0,000 01	16	kein Tetanus	überlebt
Desgl.	0,2	20	0,000 01	15	„ „	„
Die „weiße Materie“, ätherlöslicher Teil . .	0,2	20	0,000 01	14	Tetanus	5
Desgl.	0,2	20	0,000 01	15	„	5

Die wirksame, ätherunlösliche Fraktion wurde jetzt mit kochendem Äther extrahiert, um die Amidolipotide und das anhaftende Phosphatid zu entfernen. Das Ätherextrakt war unwirksam. Da der in warmem Alkohol lösliche, in kaltem Alkohol und in Äther unlösliche Anteil der „weißen Materie“ (Phrenosinfraktion) jene Substanzen enthalten muß, die die Hauptmasse des „Protagons“ der Autoren bilden, so stehen meine Erfahrungen mit der Angabe von Landsteiner und Botteri, wonach Protagon unter den Hirnlipoiden die stärkste giftbindende Wirkung entfaltet, in guter Übereinstimmung.

Für die weitere Trennung der Bestandteile der Phrenosinfraktion habe ich mich zunächst an die Angaben Thudichums gehalten. Die Fraktion wurde zuerst, um die Anhydridbildung der Phosphatide zu verhindern, mit heißem Wasser behandelt. Sie wurde dann in heißem 95 proz. Alkohol gelöst und mit alkoholischer ammoniakalischer Bleizuckerlösung versetzt, solange Niederschlag erfolgte. Die Flüssigkeit wurde einige Zeit gekocht, dann heiß abfiltriert.

Nach Thudichum besteht der Niederschlag hauptsächlich aus den Bleisalzen der Cerebrinacide und wenig bekannter schwefelhaltiger Körper, während das Filtrat vor allem die Cerebroside — Phrenosin und Kerasin —, dann Sphingomyelin und andere wenig untersuchte Körper enthalten soll. Diese zwei Fraktionen wurden in folgender Weise weiter untersucht:

1. Der Bleiniederschlag wurde mit kochendem 95 proz. Alkohol erschöpft, um alles Phrenosin und Kerasin auszuziehen. Er wurde dann getrocknet, gepulvert, in kochendem 95 proz. Alkohol suspendiert, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff von Blei befreit und heiß filtriert. Beim Abkühlen setzte die Lösung einen weißen kristallinischen Niederschlag ab, der die freien Cerebrinacide enthalten mußte. Es wurde zur Trockne gebracht, mit Toxinlösung zusammengebracht und wie oben auf seine Wirksamkeit geprüft.

Versuch VI.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Phrenosinfraktion, bleifällbarer Teil	0,05	40	0,000 02	$16^1/_2$	kein Tetanus	überlebt
Desgl.	0,05	40	0,000 02	16	„ „	„
„	0,05	100	0,000 05	$15^1/_2$	Tetanus	19
„	0,05	100	0,000 05	18	„	17

2. Das Filtrat von der Bleifällung setzte beim Erkalten einen weißen kristallinischen Niederschlag ab und wurde nach 24 Stunden abfiltriert. Die Mutterlauge wurde auf ein kleines Volumen eingedampft, mehrere Tage stehen gelassen, bis nichts mehr ausfiel, und dann abfiltriert. Die Niederschläge wurden vereinigt und in heißem absoluten Alkohol gelöst, um einen Rest von Bleisalz, welches ungelöst zurückbleibt, zu beseitigen. Die heiße alkoholische Lösung wurde heiß filtriert, eingedampft und der Rückstand auf giftbindende Wirkung untersucht.

Versuch VII.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Phrenosinfraktion, durch Blei nicht fällbarer Teil	0,05	40	0,000 02	15	kein Tetanus	überlebt
Desgl.	0,05	40	0,000 02	14	„ „	„
„	0,05	100	0,000 05	16	„ „	„
„	0,05	100	0,000 05	16	„ „	„

Die Versuche VI und VII zeigen, daß sowohl die bleifällbare Fraktion, welche hauptsächlich aus Cerebrinaciden besteht, als auch die nicht fällbare, welche Phrenosin, Kerasin usw. enthält, wirksam sind, aber die letztere in erheblich höherem Grade. Deshalb wurde die mit Blei nicht fällbare Phrenosinfraktion weiter verarbeitet. Der Rückstand derselben wurde in heißem absoluten Alkohol gelöst und heiß filtriert. Die Lösung setzte beim Abkühlen und später beim Stehen weiße Niederschläge ab (Phrenosin und Kerasin). Aus der Mutterlauge wurde nach Entfernung des Sphingomyelins mittels Chlorcadmiums noch etwas Kerasin erhalten. Phrenosin und Kerasin wurden nach Thudichums Verfahren durch fraktionierte Kristallisation getrennt und dann auf ihre giftbindende Wirkung untersucht. Die Wirksamkeit der übrigen in der Fraktion enthaltenen Stoffe konnte wegen der kleinen Ausbeute leider nicht näher geprüft werden.

Das gereinigte Phrenosin war ein weißes Pulver, das aus heißem Alkohol beim Erkalten in Kugeln und Rosetten kristallisierte und alle Eigenschaften des Phrenosins aufwies. Das Kerasin fiel aus warmem Alkohol in Flocken aus, welche hauptsächlich aus feinen Nadeln bestanden. Doch war die Kristallform weniger einheitlich.

Versuch VIII.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Phrenosin	0,05	100	0,000 05	17	kein Tetanus	überlebt
„	0,05	100	0,000 05	17½	„ „	„
„	0,05	200	0,000 1	15	„ „	„
„	0,05	200	0,000 1	14	„ „	„
„	0,05	300	0,000 15	16	Tetanus	6
„	0,05	300	0,000 15	17	„	8
„	0,05	400	0,000 2	14	„	2
„	0,05	400	0,000 2	15	„	2
Kerasin	0,05	100	0,000 05	17	kein Tetanus	überlebt
„	0,05	100	0,000 05	15	„ „	„
„	0,05	200	0,000 1	14	„ „	„
„	0,05	200	0,000 1	15	„ „	„
„	0,05	300	0,000 15	16	Tetanus	7
„	0,05	300	0,000 15	18½	„	7
„	0,05	400	0,000 2	16	„	5
„	0,05	400	0,000 2	18	„	8
Kontrollversuch zur Giftauswertung	—	—	0,000 01	17½	„	3
Desgl.	—	—	0,000 01	16	„	3
„	—	—	0,000 02	16	„	2
„	—	—	0,000 02	17	„	2

Beide Substanzen besitzen eine annähernd gleiche und zwar im Vergleich mit den bis jetzt bekannten Stoffen eine sehr erhebliche giftbindende Wirkung.

3. Die toxinbindende Wirkung des Cerebrons.

In letzter Zeit ist ein dem Phrenosin Thudichums in vieler Beziehung nahestehender Körper von Thierfelder rein dargestellt und als Cerebron bezeichnet worden. Es war zu vermuten, daß die giftbindende Wirkung des Phrenosins auch dem Cerebron zukommen würde. Ich konnte mich eines reinen Cerebronpräparates bedienen, für dessen Überlassung ich Herrn Prof. Thierfelder zu größtem Danke verpflichtet bin.

Die Prüfung auf giftbindende Wirkung wurde in üblicher Weise vorgenommen.

Versuch IX.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Cerebron	0,05	200	0,000 1	$12^1/_2$	kein Tetanus	überlebt
„	0,05	200	0,000 1	$14^1/_2$	„ „	„
„	0,05	300	0,000 15	20	Tetanus	7
„	0,05	300	0,000 15	$13^1/_2$	„	7
„	0,05	400	0,000 2	19	„	2
„	0,05	400	0,000 2	$19^1/_2$	„	2

Kontrollversuch wie in Versuch VIII.

Somit verhält sich das Cerebron genau wie Phrenosin, und wir dürfen die mit Phrenosin erhaltenen Versuchsergebnisse wohl auf Cerebron übertragen. Wegen der geringen Menge Cerebron, welche zu meiner Verfügung stand, habe ich viele Versuche mit nach Thudichum dargestelltem Phrenosin anstatt mit Cerebron ausgeführt. Die giftbindende Wirkung des Kerasins wurde nicht weiter untersucht, weil diese Substanz noch nicht ausreichend charakterisiert ist.

In den nachstehenden Versuchen suchte ich zunächst Näheres über den Vorgang der Giftbindung zu ermitteln.

Die giftbindende Wirkung des Cerebrons ist viel niedriger, wenn man die Cerebrontoxinmischung nach der Einwirkung ohne vorgängiges Abfiltrieren injiziert.

0,05 g Cerebron wurde in 10 ccm der Toxinlösung gut verteilt. Nach 1 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur, unter häufigem Schütteln, wurden von der Mischung 0,5 ccm injiziert.

Versuch X.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Cerebron	0,05	40	0,000 02	19	kein Tetanus	überlebt
„	0,05	40	0,000 02	16½	„ „	„
„	0,05	100	0,000 05	18	„ „	„
„	0,05	100	0,000 05	16	„ „	„
„	0,05	200	0,000 1	20	Tetanus	5
„	0,05	200	0,000 1	18½	„	6

Kontrollversuch wie in Versuch VIII.

Bei dieser Versuchsanordnung ist also die giftbindende Wirkung des Cerebrons ungefähr halb so groß wie in Versuch IX. Die Bindung zwischen Toxin und Cerebron ist sonach sehr locker und wird im Tierkörper wieder zum Teil gelöst.

Ferner bedarf es nach der Mischung einer gewissen Zeit, um die „Neutralisation" des Toxins zu erreichen.

Toxin und Phrenosin wurden, wie in anderen Versuchen, gemischt und eine Probe nach 5 Minuten, eine zweite nach 10 Minuten und eine dritte nach 20 Minuten dauerndem Schütteln in der Schüttelmaschine den Versuchstieren beigebracht.

Versuch XI.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Nach 5 Minuten . . .	0,05	200	0,0001	20½	Tetanus	6
„ 5 „ . . .	0,05	200	0,0001	19	„	6
„ 10 „ . . .	0,05	200	0,0001	18	kein Tetanus	überlebt
„ 10 „ . . .	0,05	200	0,0001	15	„ „	„
„ 20 „ . . .	0,05	200	0,0001	14½	„ „	„
„ 20 „ . . .	0,05	200	0,0001	14	„ „	„

Kontrollversuch wie in Versuch VIII.

Es bedarf sonach einer gewissen Zeit (10 bis 15 Minuten) nach der Mischung, um die Entgiftung vollständig zu machen.

Wenn man die Toxinlösung gleich nach der Mischung mit Cerebron ohne vorgängiges Filtrieren injiziert, ist die Entgiftung kaum wahrnehmbar.

Versuch XII.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Cerebron	0,05	40	0,000 02	18	Tetanus	3
„	0,05	40	0,000 02	15½	„	3
„	0,05	100	0,000 05	14½	„	2
„	0,05	100	0,000 05	19	„	2

Kontrollversuch wie in Versuch VIII.

Ferner wirkt das Phrenosin entgiftend, wenn man seine Chloroformlösung mit Toxinlösung schüttelt.

Zu diesem Zwecke wurde Phrenosin (0,03 g) in einer kleinen Menge Chloroform gelöst und mit 10 ccm Toxinlösung geschüttelt. 0,5 ccm der Toxinlösung wurde injiziert.

Versuch XIII.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Phrenosin in $CHCl_3$ . .	0,03	40	0,000 02	16	kein Tetanus	überlebt
„ „ „ . .	0,03	40	0,000 02	18	„ „	„
„ „ „ . .	0,03	100	0,000 05	15	„ „	„
„ „ „ . .	0,03	100	0,000 05	16	„ „	„

Um festzustellen, ob es nach erfolgter „Verfestigung“ möglich ist, das Toxin aus der Phrenosinverbindung wieder frei zu machen, habe ich folgende Versuche ausgeführt.

Wenn man das mit Toxin imprägnierte Phrenosin in Chloroform löst, so geht das Toxin mit dem Phrenosin in Lösung und geht nicht mehr in Wasser hinein, auch wenn man noch so lange mit Wasser schüttelt. Auch bleibt das Toxin an das Phrenosin gebunden, wenn man dieses aus der Chloroformlösung durch kalten Alkohol ausfällt. Es scheint hier eine ähnliche Bindung zu bestehen wie zwischen Cobragift und Lecithin im „Cobralecithid“. Auf die Frage, wie diese Bindung zu deuten ist, soll hier nicht näher eingegangen werden.

Es kann kaum einem Zweifel unterliegen, daß diese Lipoidaffinität des Toxins eine Rolle in dem Wassermanschen Phaenomen spielt. Man darf auch daran denken, daß sie bei der Aufnahme des Toxins durch die peripheren Nerven [10]) bzw. der Verbreitung im Organismus von Wichtigkeit ist.

Andererseits ist folgendes zu bedenken: Man findet die Cerebroside (Phrenosin und Kerasin) nach Baumstark [11]) und Koch [12])

vorwiegend in der weißen Substanz des Gehirns, und danach sollte diese viel stärker giftbindend wirken als die graue. Nach Dönitz ist aber, wie oben erwähnt, gerade das Gegenteil der Fall. In bezug auf diese Frage erwähnt Ignatowsky[4]), daß „die graue Substanz sauer und die weiße alkalisch reagiert (Neumeister, Lehrbuch der physiologischen Chemie), und die Acidität der grauen Hirnsubstanz für das Tetanusgift, das gegen Säuren überhaupt sehr empfindlich ist, nicht gleichgültig sein kann“. Meine einschlägigen Versuche bestätigten die Dönitzschen Befunde, und ich bin daher geneigt, anzunehmen, daß die Wirksamkeit der grauen Substanz von anderen Momenten als dem Vorhandensein von Cerebrosiden abhängt, ohne aber der vermeintlich sauren Reaktion entscheidende Bedeutung beizumessen.

4. Die Wirksamkeit der Spaltungsprodukte des Cerebrons.

Das Cerebron zerfällt nach Thierfelder durch Behandlung mit Säuren in Galaktose, Sphingosin und eine Säure, die von Thierfelder[14]) nach genauerer Untersuchung als Cerebronsäure bezeichnet wurde.

Ich habe nach Thudichum dargestelltes „Phrenosin“ nach Thierfelders Angabe mit 10proz. Schwefelsäure in Methylalkohol

Versuch XIV.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Sphingosin	0,05	40	0,000 02	14	Tetanus	3
„	0,05	40	0,000 02	20	„	3
Sphingosinsulfat	0,05	40	0,000 02	15	„	6
„	0,05	40	0,000 02	11	„	4
Cerebronsäure	0,05	200	0,000 1	19½	kein Tetanus	überlebt
„	0,05	200	0,000 1	17½	„ „	„
„	0,05	400	0,000 2	20	„ „	„
„	0,05	400	0,000 2	22	„ „	„
„	0,05	600	0,000 3	19	leicht. Tetanus	„
„	0,05	600	0,000 3	19	„ „	„
Cerebronsäuremethylester	0,05	200	0,000 1	20½	kein Tetanus	„
„	0,05	200	0,000 1	22½	„ „	„
„	0,05	400	0,000 2	19	„ „	„
„	0,05	400	0,000 2	17	„ „	„
„	0,05	600	0,000 3	18	Tetanus	4
„	0,05	600	0,000 3	21	„	5

gespalten. Die entstandenen Produkte entsprachen den Angaben von Thierfelder[13]) über die Spaltungsprodukte des Cerebrons; die erhaltene Cerebronsäure schmolz bei 100° C und deren Methylester bei 65° C.

Sämtliche Produkte (außer Galaktose) — Cerebronsäure, Cerebronsäuremethylester, Sphingosin und Sphingosinsulfat — wurden auf giftbindende Wirkung untersucht.

Die Emulsion der Cerebronsäure mit Toxinlösung zeigte saure Reaktion gegen Lackmus, die anderen Emulsionen waren neutral.

Wie aus der Tabelle XIV ersichtlich ist, geht die giftbindende Wirkung des Cerebrons bei der Spaltung auf die saure Komponente über. Die Wirksamkeit des neutralen Cerebronsäuremethylesters ist ungefähr doppelt so groß wie die des Cerebrons, und die freie Cerebronsäure ist noch wirksamer. Die stärkere Wirkung der Cerebronsäure hängt vermutlich von deren Säurecharakter ab, da im allgemeinen Tetanustoxin gegen Säure sehr empfindlich ist.

5. Verdankt das Tetanusheilserum seine Wirkung einem Gehalt an Cerebrosiden?

Wie die ausgeführten Versuche lehren, ist die antitoxische Wirkung eines gut definierten kristallinischen Körpers, der Cerebronsäure, und ihrer Derivate nicht unbedeutend. 1 g Cerebron neutralisierte danach (Versuch XI) mindestens 4000, 1 g Cerebronsäuremethylester (Versuch XVI) mindestens 8000, 1 g Cerebronsäure (Versuch XVI) mindestens 12000 letale Dosen.

Es dürfte danach daran gedacht werden, daß die Wirkung des Tetanusheilserums und anderer Sera zu ihrem Gehalte an Cerebrosiden, vielleicht auch anderen „Lipoiden", in Beziehung steht.

Es wurde demgemäß untersucht, ob Immunsera einen größeren Gehalt an Cerebrosiden bzw. an chloroformlöslichen Lipoiden aufweisen als normale Sera.

Die betreffenden Immunsera stammten aus dem k. k. serotherapeutischen Institut zu Wien, und ich bin Herrn Prof. R. Paltauf, sowie Herrn Privatdozenten Dr. E. P. Pick für deren Überlassung zu größtem Danke verpflichtet. Als Vergleichssera dienten zuerst hier gewonnene Sera von Straßburger Tieren. Zur Sicherung des Resultates erwies es sich als wünschenswert, Normalsera von Tieren zu benutzen, die unter annähernd gleichen Ernährungsbedingungen gehalten wurden wie die Tiere, die die Immunsera geliefert hatten. Darauf hatten die oben genannten Herren neuerdings die Güte,

dem hiesigen Institut auch eine Reihe Normalsera zur Verfügung zu stellen. Die Bestimmung des Gehaltes an chloroformlöslichen Lipoiden wurde in folgender Weise ausgeführt:

25 bis 50 ccm Serum wurden mit dem zweifachen Volumen 95 proz. Alkohol versetzt und 15 Minuten auf 75° erhitzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mehrmals mit absolutem Alkohol gewaschen, Waschalkohol und Filtrat zusammen eingedampft, der Rückstand dem Niederschlage hinzugefügt und dieser jetzt mit viel Chloroform dreimal je 3 Stunden lang im Schüttelapparat geschüttelt. Nun wurde abfiltriert und der gesamte Rückstand des Chloroforms nach dem Trocknen über Schwefelsäure gewogen. Das Gewicht wurde auf 100 ccm Serum umgerechnet.

Versuch XV.

Normales Serum von Straßburger Pferden.

Nr. 1	0,2940 g
„ 2	0,3150 „
„ 3	0,3254 „
„ 4	0,3660 „
„ 5	0,3670 „
„ 6	0,3750 „
„ 7	0,4880 „
Durchschnitt	0,3614 g

Normales Serum von Wiener Pferden.

„Max“	0,3920 g
„Marius“	0,4580 „
„Martin“	0,4932 „
„Marschall“	0,5036 „
„Meister“	0,5860 „
Durchschnitt	0,4866 g

Immunsera.

Tetanusserum vom Pferde „Mylight“	0,5204 g
„ „ „ „Drusus“	0,6100 „
„ „ „ „Genius“	0,6120 „
Durchschnitt	0,5808 g

Diphtherieserum vom Pferde „Kondor“	0,5564 g
„ „ „ „Kurier“	0,5620 „
„ „ „ „Landsturm“	0,5660 „
„ „ „ „Kurat“	0,5840 „
„ „ „ „Leander“	0,5920 „
Durchschnitt	0,5721 g

Dysenterieserum	0,5500 g
Scarlatinaserum	0,5172 „
Typhusserum	0,6588 „
Durchschnitt für alle Immunsera . .	0,5760 g

Aus diesen Daten ist zu ersehen, daß die Immunsera durchschnittlich und individuell (Normalserum „Meister“ scheint eine Ausnahme zu sein) mehr chloroformlösliche Lipoide als normale Sera enthalten.

Die Vermutung jedoch, daß dieser erhöhte Lipoidgehalt mit der antitoxischen Wirkung zusammenhängen könnte, bestätigte sich, wenigstens für das Tetanusserum, nicht.

Das Chloroformextrakt desselben enthielt keine nachweisbare Menge Cerebrosid, denn es lieferte beim Sieden mit Salzsäure keine reduzierende Substanz. Ferner fehlte dem Chloroformextrakt die spezifische antitetanische Wirkung.

Versuch XVI.

25 ccm Tetanusimmunserum wurden wie in den vorigen Versuchen behandelt, aber unter Vermeidung von Erhitzung. Das Eindampfen des Filtrates und des Waschalkohols geschah im Luftstrome.

I	II	III	IV	V	VI
Chloroformextrakt des Tetanusimmunserums 25 ccm	20	0,000 01	19	Tetanus	8
Desgl.	20	0,000 01	19	„	8
„	40	0,000 02	15	„	3
„	40	0,000 02	17½	„	3
Kontrollversuch f. Giftauswertung	40	0,000 01	17½	„	3
„ „ „	40	0,000 01	16	„	3

Die geringe Verzögerung des letalen Endes, die hier nachweisbar ist, dürfte eher auf die geringe antitoxische Wirkung des auch in Chloroform übergehenden Cholesterins bzw. der Cholesterinester zu beziehen sein.

Immerhin hat die Tatsache, daß die Immunisierung eine Vermehrung des Lipoidgehaltes im Serum nach sich zieht, insofern Interesse, als sie zeigt, daß die Immunisierung mit einem Abbau der Gewebe einhergeht, wobei sog. Lipoide ins Blut übertreten und hier lange Zeit verbleiben, ähnlich wie man das für die spezifischen Antikörper annehmen muß.

Auf Grund des Beobachteten ergab sich die Frage, ob es nicht möglich wäre, Tiere gegen Tetanus durch Vorbehandlung

mit den dargestellten giftbindenden Stoffen zu schützen. Zu diesem Zwecke habe ich Versuche mit Cerebron und Cerebronsäure in Angriff genommen. Sie konnten jedoch wegen meiner Rückkehr nach Japan nicht zu Ende geführt werden. Ich hoffe, über ihr Ergebnis bald Näheres berichten zu können.

Über die toxinbindenden Bestandteile der grauen Substanz des Gehirns sind weitere Untersuchungen im hiesigen Institut in Aussicht genommen.

Auf Grund meiner Versuche gelange ich zu folgenden Schlußfolgerungen:

Trockene Gehirnsubstanz gibt bei Extraktion mit heißem Alkohol reichlich Tetanusgift bindende Substanzen an den Alkohol ab und wird dabei selbst unwirksam. Unter den abgegebenen Stoffen sind die neutralen Cerebroside, vor allem das Cerebron, besonders wirksam; den Cerebrinaciden kommt anscheinend eine schwächere Wirkung zu. Von den Spaltungsprodukten des Cerebrons wirkt nur die Cerebronsäure, aber diese sehr stark giftbindend (1 g neutralisiert bis 12000 [für Mäuse] letale Dosen). Auch der Methylester der Cerebronsäure ist sehr wirksam.

Die giftbindende Wirkung der weißen Hirnsubstanz ist großenteils auf den Gehalt an den genannten Substanzen zu beziehen. Doch ist nicht ausgeschlossen, daß sie im frischen Zustande noch andere antitoxische Stoffe enthält, die bei der Extraktion zerstört werden. Da die graue Substanz, obgleich sehr arm an Cerebrosiden, noch stärker giftbindend wirkt als die weiße, muß sie noch unbekannte, im gleichen Sinne wirksame Stoffe enthalten.

Literatur.

[1]) Wassermann und T. Takaki, Berl. klin. Wochenschrift Nr. 1, 1898.

[2]) Dönitz, Deutsche Klinik. Urban und Schwarzenberg 1903. S. 581.

[3]) Alfred Wolff-Eisner und Adolf Rosenbaum, Über das Verhalten von Organrezeptoren bei der Autolyse, spez. der Tetanus bindenden Substanz des Gehirns. Berl. klin. Wochenschrift 43, 945—947.

[4]) Ignatowsky, Zentralbl. f. Bakteriologie 35 (1903).

[5]) Landsteiner und v. Eisler, Über Agglutinin- und Lysinwirkung. Zentralbl. f. Bakteriologie 39 (1905).

[6]) Landsteiner und Botteri, Über Verbindungen von Tetanustoxin mit Lipoiden. Zentralbl. f. Bakteriologie 42 (1906).

[7]) Biltz, Much und Siebert, Behrings Beiträge, Heft 10.

[8]) Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. Tübingen 1901.

[9]) Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chem. 6. Aufl., S. 483.

[10]) Meyer und Ransom, Untersuchungen über den Tetanus. Archiv f. exp. Path. und Pharm. 49, 6.

[11]) Baumstark, Hammarstens Lehrbuch der physiol. Chem. 6. Aufl., S. 488.

[12]) Koch, Americal Journal of Physiology 11.

[13]) Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann, Bd. IV.

[14]) Thierfelder, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 43 und 49.

[15]) R. Milchner, Nachweis der chemischen Bindung von Tetanus durch Nervensubstanz. Berl. klin. Wochenschrift 1898, Nr. 17.

[16]) Asakawa, Zentralbl. f. Bakteriologie 24 (1898).

XXI.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

Sechste Mitteilung.

Zur Theorie der Homogentisinsäurebildung.

Von **E. Friedmann.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Der Abbau des Tyrosins zur Homogentisinsäure vollzieht sich nach den bekannten Untersuchungen von Wolkow und Baumann [1]) unter einer eigentümlichen Atomverschiebung. Die chemischen Vorgänge, die diesen Übergang des Tyrosins in Homogentisinsäure vermitteln, formulieren diese Forscher in folgenden Gleichungen:

$$\begin{array}{c} OH + HH \\ H\diagup\!\!\diagdown H \\ \big|\quad\;\;\big| \\ H\diagdown\!\!\diagup H \\ | \\ CH_2.CH(NH_2).COOH \\ + HH \end{array} + 5\,O = \begin{array}{c} H \\ OH\diagup\!\!\diagdown H \\ \big|\quad\;\;\big| \\ H\diagdown\!\!\diagup OH \\ | \\ CH_2.COOH \end{array} + NH_3 + CO_2 + 2H_2O.$$

„Man sieht daraus," schreibt ein Schüler Baumanns, H. Embden [2]), „daß der im Körper des Alkaptonmannes verlaufende anomale Vorgang, der zur Bildung der Homogentisinsäure führt, sich darstellt als eine Kombination von gleichzeitig an demselben Molekül verlaufenden Reduktions- und Oxydationserscheinungen, eine Kombination, wie sie bekanntlich das charakteristische Merkmal der durch Hefen bewirkten Umwandlungen ausmacht."

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 277.

[2]) Ebenda 17, 184.

Die Untersuchungen von Zincke[1]), Auwers[2]) und besonders die von Bamberger[3]) haben nun eine Klasse von Verbindungen bekannt gemacht, bei denen der Übergang der Parareihe in die Metareihe, der im wesentlichen die Umlagerung bei der Bildung der Homogentisinsäure charakterisiert, eine regelmäßig zu beobachtende Erscheinung ist. Es sind dies die Chinole. So geht z. B. Toluchinol unter Wanderung der Methylgruppe in Methylhydrochinon über:

OH CH$_3$ → OH, —CH$_3$, OH

Toluchinol — Methylhydrochinon

Als Ausgangsmaterial zur Darstellung dieser Chinole dienten Bamberger die Arylhydroxylamine, bei denen sich nach den ausgedehnten Untersuchungen dieses Forschers und seiner Schüler die Umlagerungen im Sinne folgender Gleichungen abspielen:

CH$_3$, NH.OH → OH CH$_3$, NH → OH CH$_3$, O → OH, —CH$_3$, OH

Ebenso gelang es Bamberger[4]), aus p-Kresol durch Oxydation mit Caroscher Säure Toluchinol darzustellen, eine Substanz, die leicht in Toluhydrochinon umgelagert werden kann:

CH$_3$, OH → OH CH$_3$, O → OH, —CH$_3$, OH

[1]) Berl. Ber. 28, 3121 u. 34, 253.
[2]) Ebenda 30, 755 u. 32, 3443.
[3]) Ebenda 33, 3600.
[4]) Ebenda 36, 2031.

Bei dieser Sachlage liegt die Vermutung nahe, chinolähnliche Verbindungen als Zwischenglieder beim Übergang von Tyrosin in Homogentisinsäure anzunehmen, etwa im Sinne folgender Formeln:

$CH_2 . CH(NH_2) . COOH$ (p-Stellung: OH) → OH, $CH_2 . COOH$ (Chinol, =O) → OH, $—CH_2 . COOH$, OH

Tyrosin Homogentisinsäure

Ich habe im Januar 1907 im physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg nach dieser Richtung Versuche angestellt und damit begonnen, zu prüfen, ob Arylhydroxylamine mit saurer Seitenkette ebenfalls die typischen Chinolumlagerungen erkennen lassen.

Obgleich diese Versuche, wie die damit zusammenhängenden physiologischen Experimente noch nicht zum Abschluß gelangt sind, möchte ich doch den mich leitenden Gedankengang zur Kenntnis der Fachgenossen bringen, um so mehr, als die Bearbeitung der Bildung der Homogentisinsäure von verschiedener Seite in Angriff genommen ist, und die in dem soeben [1]) erschienenen Heft der Berliner Berichte mitgeteilte Arbeit von Kumagai und Wolffenstein [2]), in der über die Bildung von Homohydrochinon aus p-Kresol durch Oxydation von p-Kresol mittels Kaliumpersulfats in saurer Lösung berichtet wird, die chemischen Tatsachen, die mich zur Anstellung meiner Versuche geführt haben, einem breiteren Publikum wieder in Erinnerung bringen.

p-Hydroxylaminophenylessigsäureäthylester.

Die Darstellung des p-Hydroxylaminophenylessigsäureäthylesters geschah analog der Darstellung des Mesitylhydroxylamins aus Nitromesitylen [3]).

10 g p-Nitrophenylessigsäureäthylester wurden in 25 ccm absolutem Alkohol gelöst und mit 10 ccm einer 10proz. Ammoniumchloridlösung versetzt. In die klare Lösung wurden bei 67 bis 72° innerhalb von 20 Minuten 16 g Zinkstaub eingetragen. Nach Abfiltrieren des Zinkstaubes und Auswaschen dieses mit wenig

[1]) Heft vom 8. Februar 1908.
[2]) Berl. Ber. 41, 297.
[3]) Ebenda 33, 3626.

Alkohol wurde die alkoholische Flüssigkeit auf 150 g Eis gegossen und der dabei auffallende, zuerst ölige, dann erstarrende Körper nach dreistündigem Stehen abgesaugt. Das Filtrat wurde mit 200 ccm gesättigter Kochsalzlösung versetzt und ausgeäthert. Der ätherische Auszug hinterließ nach Abdestillieren des Äthers und Entfernung der letzten Ätherreste im Vakuum über Schwefelsäure 3,8 g einer öligen, rasch kristallisierenden Substanz. Zur Reinigung wurde diese wiederholt aus Benzol-Petroläther und Schwefelkohlenstoff-Petroläther umkristallisiert. Die Substanz kristallisiert in großen Blättchen vom Schmelzpunkt 64,5° (unkorrigiert) und ist das gesuchte Hydroxylaminoderivat. Sie reduziert Fehlingsche Lösung bereits in der Kälte und läßt nach Behandeln mit Schwefelsäure typische Chinolreaktionen erkennen.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure und Paraffin getrocknet.

0,1284 g Substanz gaben 0,2901 g CO_2 und 0,0854 g H_2O,
0,2164 „ „ „ 13,59 ccm N (13,6°, 767,8 mm).

	Berechnet für $C_{10}H_{13}NO_3$	Gefunden
C	61,51 Proz.	61,62 Proz.
H	6,72 „	7,79 „
N	7,20 „	7,48 „

Berlin, den 9. Februar 1908.

XXII.

Über das Glykokoll des normalen Harns.

Von Dr. **Gustav Embden**

und Dr. **Alfred Marx,**

derzeit Assistenzarzt am Städtischen Krankenhause zu Karlsruhe.

(Aus der inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses [damaliger Oberarzt Professor C. v. Noorden] und aus dem chemisch-physiologischen Institut der Städtischen Krankenanstalten zu Frankfurt a. M.)

Nachdem Ignatowski[1]) im Harn unter gewissen pathologischen Verhältnissen, namentlich in Fällen von Gicht, Leukämie und Pneumonie Glykokoll aufgefunden hatte, gelang es Embden und Reese[2]) aus einer größeren Zahl normaler Harne unter Anwendung einer geringfügigen methodischen Modifikation Glykokoll zu gewinnen.

Dieser Befund ist von einer Reihe von Forschern zum Teil nachgeprüft, zum Teil der Kritik unterzogen worden. Die Ergebnisse dieser Nachprüfungen und Kritiken unserer Versuche sind recht verschiedenartig. Jedenfalls waren sie für uns Veranlassung, die früheren Versuche nochmals zu wiederholen und nach verschiedenen Richtungen zu erweitern. Die Resultate dieser neuen Untersuchungen sollen im folgenden an der Hand der wesentlichsten gegen unsere frühere Arbeit erhobenen Einwände dargelegt werden.

In aller Kürze nur soll hier zunächst auf die Einwendungen Kionkas eingegangen werden, dem früher „bei genauer Befolgung der Ignatowskischen Vorschrift in zahlreichen Kontrolluntersuchungen am normalen Menschen und am Hunde“ der Glykokoll-

---

[1]) A. Ignatowski, Über das Vorkommen von Aminosäuren im Harn, vorzugsweise bei Gicht. Zeitschr. für physiol. Chem. 42, 388 (1904).

[2]) G. Embden, XXII. Kongreß für innere Medizin. Wiesbaden 1905. G. Embden und H. Reese, Über die Gewinnung von Aminosäuren aus normalem Harn. Diese Beiträge 7, 411 (1905).

nachweis niemals gelungen war[1]) und der neuerdings behauptet, daß es für den Glykokollnachweis im Harn ganz gleichgültig sei, „ob man bei schwacher, wie Ignatowski, oder bei starker Alkaleszenz, wie Embden es vorschlägt, die Reaktion zwischen der Aminosäure und dem β-Naphtalinsulfochlorid geschehen läßt“ [2]).

Wir möchten demgegenüber auf Grund vielfältiger Versuche darauf hinweisen, daß es für die Gewinnung der Glykokollverbindung und von anderen β-Naphtalinsulfoaminosäuren aus Harn in erster Linie auf den Alkaleszenzgrad des Harns ankommt. Hierin stimmen mit uns auch Abderhalden und Schittenhelm überein, welche, nachdem sie in früheren Versuchen bei schwacher Alkaleszenz des Harns keine oder doch nur geringe Mengen von Reaktionsprodukten erhalten hatten[3]), Glykokoll im normalen menschlichen Harn nachweisen konnten, wenn sie sich an die von uns angewandten Versuchsbedingungen hielten[4]). Auch Samuely gelangt im wesentlichen zu dem gleichen Ergebnisse, wenn er auch die Anschauung ausspricht, daß die „stark alkalische Reaktion keine conditio sine qua non für den qualitativen Nachweis“ des Glykokolls ist[5]).

Auf die Bedeutung des Alkaleszenzgrades bei der Anwendung der Naphtalinsulfochloridmethode auf den Harn werden wir weiter unten zurückkommen müssen, hier wollen wir nur eins nochmals hervorheben:

An der Tatsache, daß sich aus jedem normalen Menschenharn Glykokoll gewinnen läßt, kann unseres Erachtens kein Zweifel mehr bestehen.

Ist nun aber dieses Glykokoll wirklich als solches im Harn präformiert?

Wir selber haben uns in unserer ausführlichen Mitteilung sehr vorsichtig über diesen Punkt ausgesprochen und ausdrücklich auf die Möglichkeit hingewiesen, daß das Glykokoll im Harn ur-

---

[1]) H. Kionka, Glykokoll und Harnstoff in ihren Beziehungen zur Harnsäure. Zeitschr. für experimentelle Pathologie und Therapie 2, 23, Fußnote (1906).

[2]) H. Kionka und E. Frey, Beiträge zur Kenntnis der Gicht. Zeitschrift für experimentelle Pathologie und Therapie 3, 598 (1906).

[3]) E. Abderhalden und A. Schittenhelm, Über den Gehalt des normalen Menschenharns an Aminosäuren. Zeitschr. für physiol. Chem. 47, 340 (1906).

[4]) Ebenda, S. 342.

[5]) F. Samuely, Zur Frage der Aminosäuren im normalen und pathologischen Harn. Zeitschr. für physiol. Chem. 47, 378 (1906).

sprünglich nicht in freier, sondern in Form irgendwelcher gepaarter Verbindungen vorhanden ist[1]).

Verschiedene Autoren sehen es als ausgemacht an, daß die von uns gewonnene beträchtliche Glykokollmenge erst während der chemischen Verarbeitung des Harns aus anderen Substanzen abgespalten wird.

So zunächst Wohlgemuth und Neuberg[2]). Sie bemängeln einmal, daß wir den Harn in unseren früheren Versuchen nach Bleifällung, Entbleien und Ansäuern mit Mineralsäure zur Entfernung der Hippursäure 16 bis 20 Stunden im Extraktionsapparat mit Äther bei mineralsaurer Reaktion extrahierten und sprechen die Anschauung aus, daß wir hierdurch anstatt der Beseitigung der Hippursäure wahrscheinlich eine Spaltung dieser Substanz unter Glykokollbildung bewirkten — ohne freilich diese Anschauung einer experimentellen Prüfung zu unterziehen.

Wir haben uns nun davon überzeugt, daß unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen eine Spaltung der Hippursäure bei der Extraktion auch nicht im geringsten Umfange eintritt.

Versuch: 0,5204 g trockener Hippursäure wurden in Wasser suspendiert und in einem großen Extraktionsapparat nach Kutscher-Stendel bei mineralsaurer Reaktion extrahiert. Die zugesetzte Säuremenge (etwa 5 ccm offizineller Salzsäure) war größer als in den Harnversuchen, wo meist 2 bis 3 ccm Säure zur Verwendung kamen. Die Extraktion wurde nach drei Tagen unterbrochen und der Inhalt des Extraktionskölbchens zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet. Die gefundene Stickstoffmenge betrug 0,0406 g, während sich für 0,5204 g Hippursäure 0,0407 g Stickstoff berechnen.

Der Stickstoff der Hippursäure war also quantitativ in den Äther übergegangen, und es konnte demzufolge während der Extraktion keine Spaltung der Hippursäure unter Bildung des ätherunlöslichen Glykokolls stattgefunden haben.

Es sei hier überdies ausdrücklich hervorgehoben, daß in allen späteren Versuchen von Embden und Reese, insbesondere in allen Versuchen, in denen Glykokoll isoliert wurde, die Beseitigung der Hippursäure nicht durch Extraktion mit Äther im Extraktionsapparat, sondern durch fünf- bis sechsmaliges Schütteln mit Essigester bewirkt wurde.

---

[1]) G. Embden und H. Reese, l. c., S. 424.

[2]) J. Wohlgemuth und C. Neuberg, Zur Frage des Vorkommens von Aminosäuren im normalen Harn. Medizinische Klinik 1906, S. 227.

Auf ein weiteres, von Wohlgemuth und Neuberg gegen unsere Versuche erhobenes Bedenken werden wir am Schlusse unserer Arbeit noch eingehen müssen.

Im übrigen gelangen Wohlgemuth und Neuberg zu ihrer Schlußfolgerung, daß im Harn „präformiert keine physiologisch irgendwie in Betracht kommenden“ Glykokollmengen sich finden, nicht auf Grund einer Nachprüfung unserer Versuche mittels der Fischer-Bergellschen Naphtalinsulfochloridmethode, sondern sie wenden die Naphtylisocyanatmethode von Neuberg und Manasse an. Diese Methode hat sich aber unterdessen gerade in ihrer Anwendung auf den Harn als so wenig brauchbar erwiesen [1]), daß wir den mit ihr gewonnenen Resultaten Wohlgemuths und Neubergs keinerlei Beweiskraft zuzuerkennen vermögen.

Ebensowenig wie ein Laborationsprodukt aus Hippursäure, ist das von Embden und Reese im Harn nachgewiesene Glykokoll ein solches aus Harnsäure, wie Hirschstein [2]) das annimmt. Hirschstein gelangt zu seiner Annahme auf Grund von Versuchen, in denen er reine Harnsäure längere Zeit mit Natronlauge von 5 Proz. und β-Naphtalinsulfochlorid schüttelte. Er gewann so ein Reaktionsprodukt, das er auf Grund seiner leichten Löslichkeit in Ammoniak und der starken Fällung durch Baryumsalzlösung als β-Naphtalinsulfoglykokoll ansieht.

Ganz abgesehen davon, daß durch diese Angaben Hirschsteins die Identität des von ihm erhaltenen Reaktionsproduktes mit β-Naphtalinsulfoglykokoll unseres Erachtens in keiner Weise erwiesen ist, arbeitete er unter völlig von den unseren abweichenden Versuchsbedingungen.

Hirschstein ließ die Einwirkung von Naphtalinsulfochlorid auf Harnsäure bei einem Gehalt an Natronlauge von 5 Proz. vor sich gehen! In der Arbeit von Embden und Reese [3]) ist der Alkalizusatz zum Harn ausdrücklich angegeben. Wenn der bei ihrer Versuchsanordnung vor der Schüttelung stark saure Harn mit so viel Alkali versetzt war, daß blaues Lackmuspapier eben nicht mehr gerötet wurde, fügten sie dem Harn etwa 20 bis 40 ccm Normalnatronlauge pro Liter zu. Der Gehalt

[1]) L. Hirschstein, Berl. Klin. Wochenschr. 1906, Nr. 19; ferner Th. Brugsch und A. Schittenhelm, Zur Stoffwechselpathologie der Gicht. Verhandl. des 24. Kongresses für innere Medizin. Wiesbaden 1907. Diskussionsbemerkungen, S. 250 und 251.

[2]) L. Hirschstein, Die Beziehungen des Glykokolls zur Harnsäure. Zeitschr. für experimentelle Pathologie und Therapie 4, 129 und 130 (1907).

[3]) Embden und Reese, l. c., S. 413.

des Harns an Natriumhydroxyd betrug demnach in ihren Versuchen etwa 0,08 bis 0,16 Proz. Es war demnach der Alkaligehalt in den Versuchen von Hirschstein 31 bis 62 mal größer als in den Versuchen von Embden und Reese. Daß unter diesen Umständen die Deduktionen Hirschsteins hinfällig sind, bedarf keiner weiteren Erörterung.

Wir möchten dennoch an dieser Stelle den Hinweis darauf nicht unterlassen, daß Hirschstein auch in jenen Fällen, wo er — nach seiner Meinung im Gegensatz zu der von uns verwandten „stark" alkalischen Reaktion — bei „schwach" alkalischer Reaktion arbeitete, in Wahrheit dem Harn erheblich größere Alkalimengen zuführte als wir sie in unseren Versuchen mit „starker" Alkaleszenz jemals anwendeten. Hirschstein[1]) fügte dem genau neutralisierten und von 400 auf 100 ccm eingeengten Harnquantum 10 ccm Normalnatronlauge hinzu, was einem Gehalt an Natriumhydroxyd von etwa 0,36 Proz. entspricht, gegenüber den eben erwähnten 0,08 bis 0,16 Proz. in den Versuchen von Embden und Reese.

Abderhalden und Schittenhelm[2]) bestätigten das Tatsächliche der von Embden und Reese erhobenen Befunde in allen Punkten. Nur geben sie dem Glykokollbefund im Harn insofern eine bestimmtere Deutung, als die eben genannten Autoren, als sie es als sicher ansehen, daß das unter den von Embden und Reese gewählten Alkaleszenzbedingungen im Harn in erheblicher Menge nachweisbare Glykokoll nicht in freier Form vorhanden ist[3]) (wenn sie auch auf Grund ihrer Beobachtungen am schwach alkalisierten Harn das Vorhandensein von freien Aminosäuren in geringer Menge zugeben[4]). Sie gelangten zu der Annahme einer besonderen Bindung des nach Embden und Reese aus normalem Harn gewinnbaren Glykokolls an der Hand von Versuchen mit Aminosäurezusatz. Dem Urin zugesetzte Aminosäuren sind nach ihnen — im Gegensatz zu dem aus Harn ohne Zusatz gewinnbaren Glykokoll — bereits bei schwächerer Alkaleszenz nachweisbar.

Es mag dies für größere, dem Harn zugefügte Aminosäuremengen zutreffen; dem Harn zugefügte geringe Glykokollmengen

---

[1]) L. Hirschstein, l. c., S. 119.

[2]) E. Abderhalden und A. Schittenhelm, Über den Gehalt des normalen Menschenharns an Aminosäuren. Zeitschr. für physiol. Chem. 47, 339 bis 345.

[3]) Dieselben, l. c., S. 344.

[4]) Dieselben, l. c., S. 340.

reagieren mit β-Naphtalinsulfochlorid erst bei demselben Alkaleszenzgrade, wie das von vornherein im Harn vorhandene Glykokoll.

Versuch: Je 315 ccm desselben schwach alkalisch reagierenden Harns[1]) werden getrennt verarbeitet:

Portion A ohne weiteren Zusatz.

Portion B nach Zusatz von 0,1 g lufttrockenem Glykokoll.

Beide Harnportionen werden im übrigen völlig gleich behandelt:

Erste Schüttelung: Drei Stunden unter Zusatz von je 10 ccm 10prozentiger ätherischer β-Naphtalinsulfochloridlösung. Beide Flüssigkeiten reagieren nach dieser Zeit amphoter. Je 10 ccm werden entnommen. Beim Ansäuern mit Salzsäure tritt keine Spur von Trübung auf.

Zweite Schüttelung: Zu den verbleibenden Flüssigkeiten wird je 1 ccm einer doppeltnormalen Natronlauge zugesetzt. Der Harn reagiert deutlicher alkalisch als vor der ersten Schüttelung, aber noch mit violetter Farbe. Wiederum wird drei Stunden geschüttelt und in derselben Weise, wie bei der ersten Schüttelung Proben entnommen. Beim Ansäuern tritt in beiden Proben keine Spur von Trübung auf.

Dritte Schüttelung: Zu jeder Flüssigkeit werden nunmehr 2,2 ccm doppeltnormaler Natronlauge hinzugefügt. Rotes Lackmuspapier wird stark violett gefärbt. Nochmaliger Zusatz von 20 ccm β-Naphtalinsulfochloridlösung und abermalige dreistündige Schüttelung. In den hiernach wiederum entnommenen Proben tritt beim Ansäuern eine deutliche, in beiden Flüssigkeiten etwa gleich starke Trübung auf.

Aus diesem Versuch geht, wie wir glauben, mit Sicherheit hervor, daß dem Harn zugefügte geringe Glykokollmengen mit β-Naphtalinsulfochlorid erst bei demselben Alkaleszenzgrade zu reagieren beginnen, wie das von vornherein im Harn vorhandene Glykokoll.

Ganz entsprechende Versuche mit d-l-Alanin haben übrigens bereits Embden und Reese mit dem gleichen Ergebnis ausgeführt und kurz veröffentlicht[2]).

Nach Abderhalden ist es auch deswegen naheliegend, an eine Abspaltung von gebundenem Glykokoll zu denken, weil dieses erst gewonnen werden konnte, wenn der Harn mehrere Stunden, ja mehrere Tage mit ziemlich reichlichen Alkalimengen behandelt worden war[3]).

Es ist nun zunächst richtig, daß Embden und Reese in ihren Versuchen den Harn sehr lange mit β-Naphtalinsulfochlorid

---

[1]) Der Harn war zuvor mit Blei gefällt, durch Schwefelwasserstoff entbleit, von Hippursäure (durch Ausschütteln mit Essigäther bei mineralsaurer Reaktion) befreit und schwach alkalisiert worden.

[2]) Embden und Reese, l. c., S. 424.

[3]) E. Abderhalden, Lehrbuch der physiologischen Chemie, S. 287 (1906).

geschüttelt haben, aber nicht deshalb, weil die Reaktion langsam einsetzte, sondern deshalb, weil sie langsam zu Ende ging.

In neuen Versuchen haben wir, bei zum Teil sehr kurz andauerndem Schütteln, zwar wesentlich geringere Mengen Rohprodukt, dagegen recht erhebliche Ausbeuten an völlig reinem oder doch nahezu reinem β-Naphtalinsulfoglykokoll erhalten. Es ist dies wohl dadurch bedingt, daß das Glykokoll besonders leicht und rasch mit β-Naphtalinsulfochlorid reagiert und daher bei früher Unterbrechung des Versuchs weit weniger mit anderen Reaktionsprodukten verunreinigt ist, als nach lange anhaltendem Schütteln. Oft ist das nach kurz dauerndem Schütteln gewonnene Reaktionsprodukt von vornherein nahezu frei von β-Naphtalinsulfamid. Jedenfalls kann nach Abtrennung des Amids durch einfaches Umkristallisieren aus warmem Wasser[1]) sehr leicht analysenreine Glykokollverbindung in oft reichlicher Menge erhalten werden. Wir teilen im folgenden eine Reihe solcher Versuche kurz mit:

1. Harn vom Laboratoriumsdiener I. 1140 ccm Tagesmenge. Nach dem Entbleien verarbeitete Menge 750 ccm. Schüttelungsdauer zwölf Stunden.

Gewonnene Menge β-Naphtalinsulfoglykokoll:
(Schmelzpunkt 153° bis 154°) . . . . = 0,386 g.
Auf die Tagesmenge berechnet . . . . = 0,587 g.

2. Harn von derselben Versuchsperson. Tagesmenge 1270 ccm, davon verarbeitet 910 ccm. Schüttelungsdauer vier Stunden. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus warmem Wasser hat die Substanz den Schmelzpunkt 151° bis 152. Ausbeute: 0,4065 g.

Auf die Tagesmenge berechnet . . . . = 0,516 g.

3. Harn von derselben Versuchsperson. Tagesmenge 1020 ccm, davon verarbeitet 750 ccm. Schüttelungsdauer eine Stunde. Ausbeute: 0,264 g eines bei 147° schmelzenden Präparates.

Auf die Tagesmenge berechnet . . . . = 0,359 g.

4. Harn vom Laboratoriumsdiener II. Gesamtmenge 2450 ccm, davon verarbeitet 1400 ccm. Schüttelungsdauer zweieinhalb Stunden. Ausbeute: 0,240 g eines bei 146° schmelzenden Präparates.

Auf die Tagesmenge berechnet . . . . = 0,420 g.

Elementaranalyse:

0,1096 g Substanz gaben 0,2192 g CO_2 und 0,0406 g H_2O.

---

[1]) Wir haben in unseren neuen Versuchen das zum Umkristallisieren benutzte Wasser nur auf dem Wasserbade erwärmt, nicht wie früher zum Sieden erhitzt. Wir folgten hierbei einer Angabe Samuelys (l. c., S. 383), die sich uns bewährte.

Für β-Naphtalinsulfoglykokoll

gefunden:	berechnet:
54,54 Proz. C	54,34 Proz. C
4,14 „ H	4,15 „ H

5. Harn von derselben Versuchsperson. Tagesmenge 2500 ccm, davon verarbeitet 1800 ccm. Schüttelungsdauer eine Stunde.

Ausbeute an einem nicht völlig scharf bei 146° schmelzenden Präparat: 0,280 g, auf die Tagesmenge berechnet 0,394 g.

Elementaranalyse:

0,1126 g Substanz gaben 0,2268 g CO_2 und 0,0460 g H_2O.

Gefunden:	Berechnet:
54,90 Proz. C	54,34 Proz. C
4,56 „ H	4,15 „ H

6. Harn von derselben Versuchsperson. Tagesmenge 2400 ccm, davon verarbeitet 1600 ccm. Schüttelungsdauer vier Stunden. Das aus Wasser zweimal umkristallisierte Präparat schmilzt bei 153 bis 154°. Ausbeute: 0,317 g. Auf die Tagesmenge berechnete reine Glykokollverbindung: 0,476 g.

Die beiden Laboratoriumsdiener, an deren Harn die eben mitgeteilten Versuche angestellt wurden, waren anscheinend völlig gesund. Aus dem Harn der ersten Versuchsperson wurden — auf die Tagesmenge berechnet — nach zwölfstündigem Schütteln mit β-Naphtalinsulfochlorid 0,587 g (Versuch 1), nach vierstündigem Schütteln 0,516 g analysenreines β-Naphtalinsulfoglykokoll gewonnen. Nach einstündigem Schütteln wurde aus dem Harn derselben Versuchsperson ein etwas zu niedrig schmelzendes Präparat in einer Menge von 0,359 g (auf die Tagesmenge berechnet) erhalten.

Ein bei der gleichen Temperatur schmelzendes, nach zweieinhalbstündigem Schütteln gewonnenes Präparat aus dem Harn der Versuchsperson II, dessen Menge 0,420 g (auf die Tagesmenge berechnet) betrug, gab trotz seines etwas zu niedrigen Schmelzpunktes mit den richtigen völlig übereinstimmende Analysenwerte, während ein durch einstündige Schütteldauer aus dem Harn derselben Versuchsperson gewonnenes Produkt bei der Analyse etwas zu hohe Kohlenstoffwerte gab. (Versuch IV.)

Sehr stark war aber, wie aus der Analyse hervorgeht, auch dieses Präparat, dessen Menge, auf das Tagesquantum berechnet, 0,394 g betrug, nicht verunreinigt. (Versuch V.)

Nach vierstündigem Schütteln wurde aus dem Harn der gleichen Versuchsperson ein richtig schmelzendes Präparat in einer auf das Harntagesquantum berechneten Menge von 0,476 g gewonnen.

Ziehen wir nun jene Präparate in Betracht, welche sich entweder durch ihren Schmelzpunkt, oder durch die Elementaranalyse als praktisch rein erwiesen, so wurde, um es nochmals zu wiederholen, aus der Harntagesmenge der ersten Versuchsperson nach zwölfstündigem Schütteln 0,587 g, aus einer anderen Harntagesmenge nach vierstündigem Schütteln 0,5167 g β-Naphtalinsulfoglykokoll gewonnen.

Die Harntagesmenge der zweiten Versuchsperson lieferte nach zweieinhalbstündigem Schütteln 0,420 g und nach vierstündigem Schütteln 0,476 g reines Naphtalinsulfoglykokoll.

Die von anderen Autoren, namentlich von Abderhalden und Schittenhelm[1]) aus normalem Harn gewonnenen Glykokollmengen lassen sich mit den von uns erhaltenen Ausbeuten nicht streng vergleichen, da sie auf 1000 ccm Harn berechnet sind.

Immerhin dürfte es sich, wenigstens bei einem Teil unserer Versuche, um die größten bisher überhaupt aus normalem Harn erhaltenen Glykokollmengen handeln.

Zweierlei möchten wir noch bezüglich dieser Glykokollmengen hervorheben.

Das von uns gewonnene Glykokoll entspricht, wie wir ganz in Übereinstimmung mit den von Abderhalden und Schittenhelm aus ihren Versuchen gezogenen Schlußfolgerungen betonen möchten, sicherlich nicht der gesamten, im Harn vorhandenen Menge.

Das Umkristallisieren des β-Naphtalinsulfoglykokolls aus warmem Wasser ist naturgemäß mit sehr großen Verlusten verbunden.

Andererseits soll ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß keineswegs sich aus jedem Harn reine Glykokollverbindung in den oben mitgeteilten Mengen gewinnen ließ. Die Darstellung der reinen, oder annähernd reinen Substanz gelang uns zwar überall, wo wir sie versuchten, war aber durchaus nicht immer so leicht durchführbar, wie bei den beiden oben genannten und mehreren anderen Versuchspersonen.

Nach unseren Erfahrungen scheint die Glykokollmenge im normalen Menschenharn individuell nicht unerheblich zu schwanken, oder mindestens die Gewinnung der normalen Substanz nicht bei allen Versuchspersonen gleich leicht zu sein.

Verschiedene Autoren, so namentlich Abderhalden und Schittenhelm, sowie auch Wohlgemuth und Neuberg weisen auf die Möglichkeit hin, daß durch die von uns angewandte „stark“ alkalische Reaktion Substanzen, welche Glykokoll in gepaarter Form enthalten, sehr leicht gespalten werden könnten.

Demgegenüber ist hervorzuheben, daß in unseren Versuchen die dem Harn zugefügte Alkalimenge den vorhandenen Mengen an Amidosäuren gegenüber zwar möglicherweise erheblich größer

---

[1]) Abderhalden und Schittenhelm, l. c., S. 343.

war, als es der ursprünglichen Fischer-Bergellschen Vorschrift entspricht; die prozentische Konzentration an Alkali war aber weit geringer, als in den Versuchen von Emil Fischer und Bergell. Fischer und Bergell lösten die Aminosäuren in der äquimolekularen Menge normaler Natronlauge, während in unseren Versuchen der Alkalizusatz zum Harn etwa 0,08 bis 0,16 Proz. Natronlauge entspricht.

Der von uns gewählte Alkalizusatz erhebt sich jedenfalls nicht wesentlich über den zum Nachweis von Aminosäuren, welche dem Harn in geringer Menge zugesetzt wurden, notwendigen.

Will man also geringe Mengen von Aminosäuren im Harn überhaupt mittels der β-Naphtalinsulfochloridmethode nachweisen — wir halten die β-Naphtalinsulfochloridmethode für die einzige einstweilen für diesen Zweck überhaupt in Betracht kommende —, so muß man sich des von uns gewählten Alkaleszenzgrades bedienen.

Werden hierbei glykokollhaltige Verbindungen — bekannter oder unbekannter Art — gespalten, so gibt es einstweilen kein Mittel, um diese Spaltung zu umgehen. Es ist aber unseres Erachtens kein Anhaltspunkt dafür vorhanden, daß das mittels der β-Naphtalinsulfochloridmethode aus normalem Harn gewinnbare Glykokoll in irgend einer anderen Form, als in der der freien Aminosäure präformiert ist. Sicher ausschließen läßt sich die Möglichkeit einer besonderen Bindung bezüglich des Glykokolls ebensowenig, wie bezüglich irgend einer anderen nur durch mehr oder weniger komplizierte chemische Methoden aus Harn gewinnbaren Substanz.

In der vorliegenden Untersuchung konnten wir also die früher von Embden und Reese gemachten Angaben durchaus bestätigen.

XXIII.

Über Acetonbildung in der Leber.

Dritte Mitteilung.

Von Dr. **Gustav Embden**
und
Dr. **Alfred Marx,**
derzeit Assistent am städtischen Krankenhaus zu Karlsruhe.
(Aus der inneren Abteilung des städtischen Krankenhauses zu Frankfurt a. M.
Damaliger Oberarzt: Prof. C. von Noorden.)

In der zweiten Mitteilung über Acetonbildung in der Leber gelangten Embden, Salomon und Schmidt[1]) auf Grund von Durchblutungsversuchen mit Isobuttersäure, Isovaleriansäure und Isobutylessigsäure und im Anschlusse an Untersuchungen früherer Autoren, namentlich diejenigen von Knoop[2]) über den Abbau aromatischer Fettsäuren, zu der Anschauung, daß die aliphatischen Fettsäuren unter Abspaltung von 2 C-Atomen vom Carboxylende her abgebaut würden.

Diese Anschauung haben wir an den höheren normalen Homologen der Buttersäure bis zur Dekansäure hinaus einer experimentellen Prüfung unterzogen.

Die wesentlichsten Ergebnisse dieser Untersuchung hat Embden bereits auf dem 23. Kongreß für innere Medizin[3]) mitgeteilt.

Ihre ausführliche Veröffentlichung erfolgt aus äußeren Gründen erst jetzt.

Wir gingen bei unseren Versuchen von folgender Überlegung aus: Wenn beim Abbau der normalen höheren Homologen mit

---

[1]) G. Embden, H. Salomon und Fr. Schmidt, Über Acetonbildung in der Leber. Diese Beiträge 8, 129.

[2]) Fr. Knoop, Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. Diese Beiträge 6, 150.

[3]) G. Embden, Beitrag zur Lehre vom Abbau des Fettes. 23. Kongreß für innere Medizin, München 1906.

gerader Kohlenstoffatomzahl immer 2 C-Atome abgespalten wurden, so mußten aus diesen Substanzen wiederum Stoffe (wahrscheinlich Säuren) mit gerader C-Atomzahl entstehen.

Waren diese Voraussetzungen richtig, so mußten aus der normalen Dekansäure über die Oktyl- und die Capronsäure, Buttersäure und demzufolge β-Oxybuttersäure, Acetessigsäure und Aceton gebildet werden, während das Gleiche bei den entsprechenden Säuren mit ungerader C-Atomzahl nicht der Fall sein durfte.

Die Versuche wurden ganz in der gleichen Weise, wie die früheren von Embden, Salomon und Schmidt, angestellt, so daß bezüglich aller technischen Einzelheiten auf deren Arbeit verwiesen werden kann; erwähnt sei nur, daß die Durchblutungszeit auch hier 75 Minuten betrug, mit Ausnahme weniger Versuche, in denen sie etwas geringer war. In allen Fällen waren die Säuren mit Ammoniak möglichst genau neutralisiert in wenig Wasser gelöst.

Tabelle I.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Im Mittel aus zwei Parallelversuchen pro Liter gebildete Acetonmenge mg
1	2 g Normalbuttersäure	148	237	128
2	2 „ „	108	173	
3	2 „ Normalvaleriansäure	19	30	20
4	2 „ „	21	34	
5	2 „ Normalcapronsäure	89	142	100
6	2 „ „	111	178	
7	2 „ Normalheptylsäure	9	14	12
8	2 „ „	15	24	
9	2 „ Normaloktylsäure	60	96	60
10	2 „ „	60	96	
11	2 „ Normalnonylsäure	9	15	19
12	2 „ „	29	46	
13	2 „ Normaldekansäure	71	114	58
14	1,5 g „	46	74	

Die Ergebnisse dieser Versuche sind aus Tabelle I ersichtlich; die Versuche sind nach der steigenden Kohlenstoffatomzahl der Säuren geordnet. Mit jeder Säure wurden zwei Parallelversuche angestellt. Als Versuche 1 und 2 (Normalbuttersäure) sind zwei

bereits von Embden, Salomon und Schmidt[1]) früher veröffentlichte mit angeführt.

In Kolonne 3 der Tabelle ist die Menge des pro Liter Blut gebildeten Acetons, in Kolonne 4 die auf die gesamte Blutmenge (1600 ccm) berechnete Acetonmenge angegeben. Aus Kolonne 5 sind für je zwei Parallelversuche die Mittelwerte der pro Liter Blut gebildeten Acetonmengen ersichtlich.

Aus den Kolonnen 3 und 4 geht hervor, daß die von uns erwartete Gesetzmäßigkeit in der Tat besteht, d. h. daß nur die Säuren mit gerader C-Atomzahl eine Steigerung der Acetonbildung in der Leber bewirken, während bei den Säuren mit ungerader C-Atomzahl die gebildeten Acetonmengen nicht größer sind, als die früher von Embden und Kalberlah[2]) bei der Durchblutung der Leber mit normalem Blute ermittelten.

Die Anschauung, daß der Abbau von Fettsäuren — wenigstens solcher mit unverzweigter Kette — in der früher angenommenen Weise erfolgt, gewinnt durch diese Versuche außerordentlich an Wahrscheinlichkeit.

Nicht nur die Entstehungsart von Oxybuttersäure, Acetessigsäure und Aceton aus Fettsäuren wird durch die von uns gewonnenen Resultate dem Verständnis näher gerückt, auch die Bildung niederer Fettsäuren aus höheren, durch Abbau vom Carboxylende her, wird durch sie recht wahrscheinlich gemacht, wenn auch der direkte Beweis für diese Entstehungsart niederer Fettsäuren — durch deren Isolierung bei der Durchblutung mit höheren — noch zu erbringen sein wird.

Mit dieser Entstehungsart der niederen Fettsäuren würde es im besten Einklange stehen, daß im tierischen Organismus und in der Natur überhaupt sich von den normalen Fettsäuren ganz vorwiegend solche mit gerader Kohlenstoffatomzahl finden, worauf Knoop[3]) auf Grund seiner Fütterungsversuche mit aromatisch substituierten Fettsäuren bereits aufmerksam gemacht hat.

Aus der Kolonne 5 der Tabelle ist ersichtlich, daß die Menge des aus den normalen Fettsäuren mit gerader C-Atomzahl gebildeten Acetons von 128 mg bei der Buttersäure bis 58 mg bei der Dekansäure sinkt. Dies erscheint ohne weiteres verständlich,

---

[1]) G. Embden, H. Salomon und Fr. Schmidt, Diese Beiträge 7, 147, Versuche 32 und 32a.

[2]) G. Embden und Fr. Kalberlah, Über Acetonbildung in der Leber. Diese Beiträge 7, 121 (1906).

[3]) Fr. Knoop, l. c.

denn einmal wird der Vorgang der Acetonbildung um so komplizierter, je länger die Kohlenstoffkette ist, je mehr Fettsäuren also intermediär gebildet werden müssen, und zweitens werden von jeder acetonbildenden Fettsäure nur die drei vom Carboxylende am weitesten entfernten Kohlenstoffatome in Aceton umgewandelt. Gleiche Acetonmengen können also nicht aus gleichen, sondern aus äquimolekularen Gewichtsmengen verschiedener acetonbildender Fettsäuren im Organismus entstehen.

In der bereits eingangs erwähnten Arbeit gelangten Embden, Salomon und Schmidt auf Grund der Tatsache, daß das Leucin im Gegensatz zu der ihm entsprechenden Fettsäure, der Isobutylessigsäure, und in Übereinstimmung mit dem nächstniederen Homologen der letzteren, der Isovaleriansäure Aceton bildet, sowie auf Grund der Resultate früherer Untersuchungen zu der Anschauung, daß die Aminosäuren unter Abspaltung des Carboxylkohlenstoffatoms in Substanzen — wahrscheinlich Fettsäuren — mit einem C-Atom weniger umgewandelt würden. Hiernach mußten also Aminosäuren mit gerader C-Atomzahl in Fettsäuren mit ungerader C-Atomzahl, Aminosäuren mit ungerader C-Atomzahl in Fettsäuren mit gerader C-Atomzahl umgewandelt werden.

Von den den höheren normalen Homologen der Buttersäure entsprechenden α-Aminosäuren mußten nach dieser Vorstellung diejenigen mit ungerader C-Atomzahl Aceton bilden, während dies bei den Aminosäuren mit gerader C-Atomzahl nicht der Fall sein durfte.

Wir haben bisher nur Versuche mit drei Homologen, der α-Aminonormalbuttersäure, der α-Aminonormalvaleriansäure und der α-Aminonormalcapronsäure ausgeführt.

Die Versuche mit der letzteren Substanz sind bereits in der mehrfach erwähnten Arbeit von Embden, Salomon und Schmidt als Versuch 11 und 12 veröffentlicht.

Aus der Tabelle II, deren Anordnung ganz die gleiche wie jene der Tabelle I ist, geht hervor, daß die erwartete Gesetzmäßigkeit für die drei untersuchten Homologen in der Tat vorhanden ist. Die Aminonormalbuttersäure (Versuch 15) bildet ganz im Gegensatz zu der ihr entsprechenden Normalbuttersäure kein Aceton, während sich die der nicht acetonbildenden Normalvaleriansäure entsprechende α-Aminonormalvaleriansäure als ein kräftiger Acetonbildner erweist.

Im Gegensatz zur Normalcapronsäure und in Übereinstimmung mit der Normalvaleriansäure beeinflußt wiederum die Aminonormalcapronsäure die Acetonbildung in der Leber nicht.

Tabelle II.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
15	etwa 1,1 g α-Aminonormalbuttersäure in wenig Wasser	16	26	—
16	2 g α-Oxybuttersäure mit Ammoniak neutralisiert	15	24	—
17	2 g α-Oxybuttersäure mit Ammoniak neutralisiert	21	34	—
18	1,5 g α-Aminonormalvaleriansäure in wenig Wasser	64	102	—
19	1,5 g α-Aminonormalvaleriansäure in wenig Wasser	41	66	—
20	2 g α-Aminonormalcapronsäure in 200 ccm Kochsalzlösung. . . .	23	41	Versuche 11 und 12 aus Embden, Salomon und Schmidt, l. c.
21	2 g α-Aminonormalcapronsäure in 150 ccm Kochsalzlösung. . . .	20	35	

Ganz ähnlich wie die α-Aminosäuren scheinen sich die α-Oxysäuren zu verhalten; wenigstens bildet die α-Oxybuttersäure, die die einzige bisher von uns untersuchte Oxysäure ist (Versuche 16 und 17), kein Aceton.

Durch die von uns bei den oben genannten drei homologen Aminosäuren gewonnenen Resultate werden die früher von Embden, Salomon und Schmidt über den Abbau der Aminosäuren geäußerten Vorstellungen wesentlich gestützt.

Der Abbau der normalen homologen Fettsäuren unter Abspaltung zweier Kohlenstoffatome vom Carboxylende her darf auf Grund der vorliegenden Untersuchung als nahezu bewiesen betrachtet werden.

XXIV.

Über Acetessigsäurebildung in der Leber[1]).

Von **Gustav Embden** und **Hans Engel.**

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut der städtischen Krankenanstalten zu Frankfurt a. M.)

In einer Reihe von Untersuchungen, die gemeinschaftlich mit Almagia, Kalberlah, Salomon, Schmidt und Marx vorgenommen wurden, konnte Embden zeigen, daß bei der künstlichen Durchblutung der lebensfrischen Leber mit normalem Blute Aceton gebildet wird.

Die Menge des im Destillat aus dem Blute nachweisbaren Acetons konnte durch Zusatz bestimmter Substanzen sehr erheblich gesteigert werden, wobei es keinem Zweifel unterlag, daß die gesteigerte Acetonbildung auf Kosten der dem Blute zugefügten Substanzen erfolgt war.

Für eine Reihe der acetonbildenden Substanzen war es von vornherein sehr wahrscheinlich, daß die Acetonbildung aus ihnen unter intermediärem Auftreten von β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure erfolgte, während bei mehreren anderen — nämlich der Isovaleriansäure und dem gewöhnlichen Leucin — nach unserer Anschauung das Aceton ohne diese intermediäre Bildung von β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure direkt aus der Isopropylgruppe entstehen sollte.

Der direkte Nachweis von β-Oxybuttersäure in dem Durchblutungsblute, den wir in bisher unveröffentlichten Versuchen mehrfach zu erbringen versuchten, gelang in keinem Falle mit Sicherheit.

---

[1]) Ein Teil der dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurde bereits von Embden auf dem 24. Kongreß für innere Medizin zu Wiesbaden, 1907, kurz erwähnt.

Vor kurzem haben Embden und Schliep[1]) eine Methode der getrennten Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure (zunächst für den Harn) angegeben, und es lag nunmehr für uns sehr nahe, diese Methode zur Entscheidung der Frage, ob im Durchblutungsblut am Ende der Durchblutung vorwiegend Aceton oder Acetessigsäure vorhanden ist, anzuwenden.

Die Ausführung der Methode gestaltet sich auch hier äußerst einfach; wie früher, wurde in aliquoten, gemessenen Teilen des nach Schenck gewonnenen Blutfiltrats (je 500 ccm) vor und nach der Durchblutung die Bestimmung des „Gesamtacetons" nach Messinger-Huppert vorgenommen. Eine ebenfalls 500 ccm betragende Filtratmenge wurde möglichst genau neutralisiert und darauf durch eine Vakuumdestillation das präformierte Aceton daraus entfernt; es war bei der relativ großen Flüssigkeitsmenge notwendig, die Vakuumdestillation etwas länger als bei den Harnversuchen vor sich gehen zu lassen. Kontrollversuche, in denen wir dem Filtrat von normalem Blute Aceton hinzufügten, erwiesen eine 50 bis 60 Minuten dauernde Vakuumdestillation, bei der etwa 100 ccm übergingen, als völlig ausreichend zur Entfernung des zugesetzten Acetons.

Nach Beendigung der Vakuumdestillation wurde die im Vakuumkolben zurückgebliebene Flüssigkeit angesäuert und nunmehr das durch Destillation bei Atmosphärendruck gewinnbare Aceton bestimmt. Dieses Aceton durfte als „Aceton aus Acetessigsäure" angesprochen werden.

Die sämtlichen Bestimmungen wurden möglichst rasch nach der Durchblutung vorgenommen, da augenscheinlich beim Stehen der sauren Flüssigkeit ziemlich bald eine Spaltung von Acetessigsäure unter Acetonbildung einsetzt.

Die Versuche wurden stets mit 1600 ccm Rinderblut angestellt; die Durchblutungsdauer betrug 60 bis 75 Minuten; auch in den übrigen Einzelheiten des Versuches suchten wir möglichst die gleichen Bedingungen wie in den früheren Versuchen einzuhalten.

Unsere Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle, welche neun Versuche umfaßt, zusammengestellt.

Aus Kolonne 2 dieser Tabelle geht die dem Durchblutungsblut zugesetzte Substanz hervor; aus Kolonne 3 die pro Liter Blut gebildete „Gesamtacetonmenge"; aus Kolonne 4 das aus Acetessigsäure gewonnene Aceton, beides in Milligrammen, während Kolonne 5 die Menge des Acetons aus Acetessigsäure in Prozenten des Gesamtacetons angibt.

In den beiden ersten Versuchen (1 und 2) wurde die Durchblutung ohne Zusatz einer acetonbildenden Substanz vorgenommen. In Versuch 1 sind von 30 mg Gesamtaceton nicht weniger als 28

[1]) G. Embden und L. Schliep, Über getrennte Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure. Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Path. d. Stoffwechsels, 1907, S. 7 u. 8.

1	2.	3.	4.	5.
Nr. des Versuchs	Dem Durchblutungsblut zugesetzte Substanz	Gebildete Menge „Gesamtaceton“ pro Liter mg	Gebildete Menge „Aceton aus Acetessigsäure“ pro Liter mg	Gebildete Menge „Aceton aus Acetessigsäure“ in Prozenten des „Gesamtacetons“ Proz.
1	Nichts	30	28	93
2	„	16	14	88
3	Normalbuttersäure 2 g (mit Ammoniak neutralisiert in wenig Wasser)	128	93	73
4	Isovaleriansäure 2 g (mit Ammoniak neutralisiert)	63	51	81
5	Dasselbe	71	61	86
6	Synthetisches Leucin 2 g in 100 ccm Kochsalzlösung von 0,85 Proz.	55	50	91
7	Synthetisches Leucin 2 g in 200 ccm Kochsalzlösung	82	70	85
8	l-Tyrosin 2 g	93	81	87
9	d-l-Phenylalanin 2 g . .	109	81	74

auf Acetessigsäure zu beziehen (93 Proz.). Im Versuch 2 von 16 mg 14. Dabei ist noch zu bedenken, daß die Werte für Acetessigsäure auch hier, gerade so wie bei den Harnversuchen von Embden und Schliep, als Minimalwerte anzusehen sind.

Man würde auf Grund dieser Versuche das Auftreten freien Acetons bei der Durchblutung mit normalem Blute überhaupt in Zweifel ziehen können, wenn nicht Embden und Kalberlah[1]) gezeigt hätten, daß eine — allerdings sehr kleine — Acetonmenge schon während der Durchblutung mit dem arterialisierenden Luftstrome verloren geht.

In Versuch 3, wo die Durchblutung unter Zusatz von 2 g Normalbuttersäure erfolgte, waren von 128 mg Gesamtaceton 93 mg (73 Proz.) als Acetessigsäure vorhanden.

Auch in den übrigen sechs Versuchen, in denen verschiedenartige acetonbildende Substanzen dem Durchblutungsblut zugesetzt wurden, ist überall in demselben nach Beendigung des Versuches ganz vorwiegend Acetessigsäure vorhanden. Für die Normalbuttersäure (Versuch 3) hatten wir dies von vornherein nicht anders

[1]) Embden und Kalberlah, Diese Beiträge 8, 128 (1906).

erwartet; hingegen hatten wir — wie bereits oben erwähnt — für die Isovaleriansäure und das Leucin angenommen, daß hier die Bildung des Acetons ohne intermediäres Auftreten von Acetessigsäure direkt aus der Isopropylgruppe erfolge.

Unsere früher über diesen Punkt geäußerte Anschauung, welche von Baer und Blum[1]) auf Grund von Versuchen an Zuckerkranken, bei denen nach Verabreichung der oben genannten Substanzen eine Vermehrung der Oxybuttersäureausscheidung im Harn auftrat, bekämpft wurde, erweist sich also als unrichtig. Freilich war uns erst jetzt durch die Methode der getrennten Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure die Möglichkeit gegeben, die hier vorliegende Frage direkt experimentell anzugreifen.

Aus den Versuchen 8 und 9 (Phenylalanin und Tyrosin) geht hervor, daß auch das aus dem aromatischen Kern abgespaltene Aceton unter intermediärer Acetessigsäurebildung entsteht. Über diesen Punkt hatten wir selbst eine bestimmte Anschauung bisher nicht geäußert, während Baer und Blum, welche auf Grund unserer Durchblutungsversuche die oben genannten Substanzen an Diabetiker verabreichten, auch hier, wie bei den Versuchen mit Leucin und Isovaleriansäure, eine vermehrte Oxybuttersäureausscheidung feststellen konnten.

Aus den eben geschilderten Versuchen geht hervor, daß augenscheinlich alle bisher untersuchten Substanzen, die bei der Leberdurchblutung Aceton bilden, intermediär Acetessigsäure und demnach voraussichtlich auch β-Oxybuttersäure entstehen lassen.

---

[1]) J. Baer und L. Blum, Über den Abbau der Fettsäuren beim Diabetes mellitus. Arch. f. experim. Path. u. Pharmak. 55, 108 ff. (1906).

XXV.

Über die Acetessigsäurebildung in der Leber des diabetischen Hundes.

Von **Gustav Embden** und **Leone Lattes** (Turin).

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut der städtischen Krankenanstalten zu Frankfurt a. M.)

Während im normalen intermediären Stoffwechsel allem Anscheine nach dauernd aus verschiedenartigen Substanzen sehr erhebliche Mengen Acetessigsäure — und daneben auch geringere Mengen Aceton — entstehen, treten von den genannten Substanzen nur Spuren ins Blut und in den Harn über.

Unter pathologischen Verhältnissen — so namentlich im Diabetes mellitus und im Fieber — und ferner auch — wenigstens beim Menschen und bei einzelnen Säugetierarten unter gewissen abnormen Ernährungsbedingungen — steigt die Ausscheidung von Acetessigsäure und Aceton an, und daneben tritt im Harn β-Oxybuttersäure auf.

Da im normalen intermediären Stoffwechsel wahrscheinlich die Leber das einzige Acetessigsäure bildende Organ ist, so lag die Vermutung nahe, daß die Veränderung, welche unter abnormen Verhältnissen zu vermehrter Acetonkörperausscheidung führt, eben in der Leber ihren Sitz habe.

Wir haben diese Vermutung im folgenden einer experimentellen Prüfung unterzogen.

Wir stellten unsere Versuche ausschließlich an Hunden an, welche unter der Einwirkung eines teils durch Pankreasexstirpation, teils durch Phlorizinvergiftung hervorgerufenen Diabetes mehr oder weniger erhebliche Mengen von „Acetonkörpern" durch den Harn ausschieden.

Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten nach Ausführung der Pankreasexstirpation bzw. nach Beginn der Phlorizinvergiftung

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8
Nr. des Versuchs	Versuchsanordnung	Durchblutungszeit Minuten	Gebildete Gesamtacetonmenge pro Liter des Durchblutungsblutes mg	Im ganzen gebildete Gesamtacetonmenge mg	Gebildete Menge Aceton aus Acetessigsäure		Bemerkungen
					pro Liter mg	in Proz. des Gesamtacetons	
1	Durchblutung der Leber einer pankreaslosen Hündin 3 Tage nach der Pankreasexstirpation mit 1600 ccm Rinderblut.	60	139	223	111	79,8	Keine Eiterung. Gewicht der Leber vor der Durchblutung ohne Zwerchfell und Canülen etwa 270 g. Ein vor der Durchblutung abgetrennter Kontrollappen von 31 g liefert nur Spuren flüchtiger, jodbindender Substanz.
2	Dasselbe.	60	71	114	54,5	76,7	Geringfügiger Bauchdeckenabszeß. Leber klein. Ein Kontrollappen von 19 g liefert nur Spuren flüchtiger, jodbindender Substanz.
3	Durchblutung der Leber eines pankreaslosen Hundes 5 Tage nach der Pankreasexstirpation mit 1600 ccm Rinderblut.	60	122	196	103	84,4	Keine Eiterung. Gewicht der Leber vor der Durchblutung ohne Zwerchfell und Canülen etwa 140 g. Ein vor der Durchblutung abgetrennter Kontrollappen von 10 g liefert nur Spuren flüchtiger, jodbindender Substanz.
4	Durchblutung der Leber eines Hundes nach 4tägiger Phlorizinvergiftung. 1600 ccm Rinderblut.	60	131	210	102	85,4	Der Hund erhielt während 4 Tagen täglich 3mal je 0,04 g Phlorizin. Gewicht der Leber vor der Durchblutung etwa 150 g. Ein Kontrollappen von 17,5 g lieferte nur Spuren flüchtiger, jodbindender Substanz.
5	Durchblutung der Leber eines Hundes nach 6tägiger Phlorizinvergiftung. 1600 ccm Rinderblut.	60	106	169	—	—	Die Phlorizininjektionen erfolgten während der letzten 6 Tage vor dem Versuch in der gleichen Weise wie in Versuch 4. Die Leber wurde vor der Durchblutung nicht gewogen. Ein Kontrollappen von 12,7 g lieferte nur Spuren flüchtiger, jodbindender Substanz.
6	Durchblutung der Leber einer Hündin nach 7tägiger Phlorizinvergiftung. 1600 cm Rinderblut.	45	68	108	—	—	Während der ersten 5 Tage erhielt der Hund 3mal täglich 0,04 g, während der letzten 2 Tage 3mal täglich 0,08 g Phlorizin.
7	Durchblutung der Leber eines Hundes nach 8tägigem Hunger. 1600 ccm Rinderblut.	55	31	49	—	—	

in Äthernarkose getötet und ihre Leber mit normalem Rinderblut künstlich durchströmt.

Im Durchblutungsblute wurde die Gesamtacetonmenge, in einem Teile der Versuche auch die Acetessigsäuremenge bestimmt. Die gewonnenen „Gesamtaceton"-Werte wurden mit den früher von Embden und Kalberlah bei Durchblutung der normalen Leber erhaltenen verglichen. Die Größe der Tiere war annähernd dieselbe, wie sie früher von Embden und Kalberlah verwendet worden war. Die Einzelheiten der Versuchsanordnung waren genau die gleichen wie in den Versuchen der eben genannten Autoren, nur daß die Arterialisierung des Blutes stets, wie überhaupt in allen unseren neueren Durchblutungsversuchen, mit Sauerstoff geschah. Eine wesentliche Veränderung im Umfange der Acetonbildung tritt hierdurch nicht ein.

Die Pankreasexstirpation wurde unter möglichst vollkommener Asepsis ausgeführt. Keines der zum Versuche verwendeten Tiere hatte gefiebert.

Die Phlorizinvergiftung geschah in der von Knopf beschriebenen Weise durch subcutane Injektion einer 1 proz. Phlorizinlösung in 25 proz. Alkohol.

Nach der Pankreasexstirpation, sowie nach Beginn der Phlorizinvergiftung erhielt keines der Tiere Nahrung.

Weitere Angaben über die Versuchsanordnung werden bei den einzelnen Versuchen gemacht werden.

Die sämtlichen Versuche sind in der nebenstehenden Tabelle I zusammengestellt. Sie finden sich hier in der Reihenfolge, in der sie ausgeführt wurden.

Die Versuche 1 bis 3 der Tabelle wurden an der Leber von pankreaslosen, die Versuche 4 bis 6 an der Leber von phlorizinvergifteten Hunden vorgenommen.

Wir betrachten zunächst die Versuche an pankreaslosen Hunden (Versuche 1 bis 3).

Die Menge des während einer 1 stündigen Durchblutung mit 1600 ccm Rinderblut pro Liter gebildeten „Gesamtacetons" (präformiertes Aceton + Aceton aus Acetessigsäure) ist in Versuch 1 = 139, in Versuch 2 = 71, in Versuch 3 = 122 mg.

Bei den Untersuchungen von Embden und Kalberlah an der Leber normaler Hunde hielt sich — unter sonst ganz gleichen Versuchsbedingungen — die Acetonbildung pro Liter zwischen 12 und 27 mg.

Die Leber des pankreaslosen Hundes bildet also weit größere Acetonmengen[1]) als die normale, in den Versuchen 1 und 3 so große, wie sie die normale Leber nur bei Zusatz der stärksten Acetonbildner (Buttersäure und β-Oxybuttersäure) zum Durchblutungsblut entstehen läßt.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Leber phlorizinvergifteter Hunde. Die Acetonbildung bewegt sich in diesen Versuchen (Versuche 4 bis 6, Kolonne 4) zwischen 68 und 131 mg pro Liter.

Wir dürfen es demnach als erwiesen ansehen, daß die Leber bei der diabetischen Acetonkörperausscheidung eine Änderung ihrer normalen Acetessigsäure bildenden Funktion im Sinne einer gewaltigen Steigerung[2]) erleidet, und wir müssen es, im Zusammenhalt mit den früheren Versuchen von Embden und Kalberlah, für sehr wahrscheinlich halten, daß die Leber der ausschließliche Sitz nicht nur der normalen, sondern auch der krankhaft gesteigerten Acetessigsäurebildung ist.

Welcher Art der zu vermehrter Acetessigsäureproduktion führende Zustand der Leber ist, ob es sich um eine cellulär bedingte Änderung im Ablauf von Fermentreaktionen, oder ob es sich vielleicht nur um die Wirkung eines besonders reichlichen Gehaltes der Leber an Acetessigsäure bildendem Material handelt, darüber geben unsere Versuche keinen Aufschluß.

Wir wollen an dieser Stelle den Hinweis auf eine recht eigenartige, während der Durchblutungsversuche von uns gemachte Beobachtung nicht unterlassen. Das dem Organ entströmende Blut war, trotz großer Strömungsgeschwindigkeit und vollkommenster Arterialisierung, ganz auffällig venös gefärbt, viel mehr, als das gewöhnlich der Fall ist. Vielleicht war diese starke Venosität des Leberblutes durch eine Steigerung des oxydativen Stoffwechsels in der Leber bedingt.

Die unmittelbare Vorstufe der Acetessigsäure, die β-Oxybuttersäure, ist in der diabetischen Leber, wie wir uns besonders überzeugten, jedenfalls höchstens in ganz geringfügigen Spuren vorhanden. Auch der Gehalt der Leber an Acetessigsäure selbst ist — vor der Durchblutung bestimmt — nur ein minimaler (siehe die Bemerkungen zu Versuch 1 bis 5).

---

[1]) Wir wenden hier das Wort „Aceton" im Sinne von „Gesamtaceton" (präformiertes Aceton + Aceton aus Acetessigsäure) an.

[2]) Wir lassen die Frage, ob es sich hierbei wirklich um eine primäre Steigerung der Acetessigsäurebildung, oder aber um eine Verminderung des Acetessigsäureabbaues in der Leber handelt, einstweilen unberührt.

Wir haben des öfteren von vermehrter Acetessigsäurebildung in der Leber gesprochen.

Daß es sich wirklich im wesentlichen um vermehrtes Auftreten von Acetessigsäure und nicht von Aceton handelt, geht aus den Angaben der Kolonnen 6 und 7 hervor. Der Acetessigsäuregehalt beträgt in den 4 Versuchen (4 bis 7), in denen Bestimmungen ausgeführt wurden, 76,7 bis 85,4 Proz. des Gesamtacetons, wobei zu bedenken ist, daß die gewonnenen Zahlen für Acetessigsäure Minimalwerte darstellen.

Alle zu unseren Versuchen verwendeten Hunde hatten nach der Pankreasexstirpation bzw. nach Beginn der Phlorizininjektionen gehungert.

Es war daher noch nötig, die Wirkung des Hungers an sich auf den Umfang der Acetessigsäurebildung in der Leber festzustellen. Wie aus Versuch 7, in dem die Leber eines Hundes, der 8 Tage gehungert hatte, zur Verwendung kam, hervorgeht, ist der einfache Hunger ohne jeden, oder doch ohne jeden merklichen Einfluß auf den Umfang der Acetessigsäurebildung in der Hundeleber, ganz entsprechend der bekannten Tatsache, daß der Hundeharn, im Gegensatze zum menschlichen, im Hunger keine Vermehrung der Acetonkörper aufweist.

Ein Parallelismus zwischen dem Umfange der nach Messinger-Huppert bestimmten „Aceton“-Ausscheidung durch den Harn und der bei der Durchblutung gebildeten „Gesamtaceton“-Menge ist in unseren Versuchen nicht erkennbar.

In der letzten vor dem Versuche gewonnenen Harntagesmenge wurden folgende Mengen „Gesamtaceton“ ausgeschieden:

Versuchsnummer	Menge Aceton mg
1	59
3	66
4	101
5	94
6	22

Wie man sieht, bleibt in allen Fällen die während 24 Stunden durch den Harn ausgeschiedene Acetonmenge weit hinter der während einer 1stündigen Durchblutung der Leber gebildeten zurück.

XXVI.

Über den Abbau der Acetessigsäure im Tierkörper.

(Erste Mitteilung.)

Von **Gustav Embden** und **Louis Michaud.**

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut der städtischen Krankenanstalten zu Frankfurt am Main.)

In einer von Embden und Engel[1]) ausgeführten Untersuchung wurde gezeigt, daß die früher, bei der künstlichen Durchströmung der Leber mit Blut beobachtete „Acetonbildung" in Wahrheit ganz wesentlich eine Bildung von Acetessigsäure ist.

In allen Fällen — mochte während der Durchblutung ein Zusatz „acetonbildender" Substanzen zum Blut erfolgt sein oder nicht — entstammte das im Destillate aus dem Durchblutungsblute nachweisbare Aceton wenigstens seiner Hauptmenge nach der im Blute am Ende des Versuches vorhandenen Acetessigsäure.

Die letztere Substanz wurde dadurch als ein Abbauprodukt recht verschiedenartiger Körper nachgewiesen. Von diesen erwähnen wir nur alle höheren Homologen der Essigsäurereihe mit unverzweigter Kette und gerader Kohlenstoffzahl, ferner die Isovaleriansäure, das Leucin, das Tyrosin, das Phenylalanin.

Allem Anschein nach ist sonach die Acetessigsäure ein überaus wichtiges, normales intermediäres Stoffwechselprodukt, das sowohl bei der Eiweiß-, wie auch bei der Fettzersetzung in voraussichtlich sehr großer Menge auftritt.

Es lag daher nahe, nachdem der Ursprung der Acetessigsäure im intermediären Stoffwechsel bis zu einem gewissen Punkte klargelegt war, nunmehr auch an die Frage heranzutreten, welche Schicksale dieses intermediäre Stoffwechselprodukt bis zu seinem

---

[1]) G. Embden und H. Engel, Über Acetessigsäurebildung in der Leber. Diese Beiträge **11**, 323 (1908).

endlichen Abbau zu Kohlensäure und Wasser durchzumachen hat. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß verfütterte Acetessigsäure recht leicht verbrennlich ist[1]), leichter als in den Organismus eingeführtes Aceton[2]), das durch den Harn und vor allem durch die Atemluft zu einem wesentlichen Anteil ausgeschieden wird.

Aus der jüngsten Zeit liegt eine Untersuchung von Pollak[3]) über die Einwirkung von Organauszügen auf Acetessigsäure vor. Pollak fand, daß nicht nur verschiedene Organauszüge, sondern auch Eiweißkörper und außerdem peptonartige Substanzen, Aminosäuren, gewisse Amide und auch Ammonsalze aus Acetessigsäure Aceton abspalten.

Die nach Messinger-Huppert bestimmbaren Acetonmengen änderten sich unter der Einwirkung der genannten Faktoren nicht wesentlich. Es fand also in den Versuchen von Pollak wohl eine Umwandlung von Acetessigsäure in Aceton, nicht aber ein Verschwinden flüchtiger, jodoformbildender Substanz statt.

Die vorliegende Arbeit fand ihren Ausgangspunkt in einer mehr zufälligen Beobachtung, die Embden gelegentlich der gemeinsam mit Lattes[4]) unternommenen Untersuchung über die Acetessigsäurebildung in der Leber von diabetischen Tieren machte: Kurze Zeit nach dem Ende eines Durchblutungsversuches, bei dem sehr reichliche Acetessigsäuremengen sich gebildet hatten, wurde eine Bestimmung des Gesamtacetons mit der zerhackten Leber angesetzt. Es ließen sich im Destillate, trotzdem die Leber bei der Durchblutung sehr erhebliche Mengen des stark acetessigsäurehaltigen Blutes in sich aufgenommen hatte, kaum Spuren von Aceton nachweisen.

Wir haben nun zunächst untersucht, ob das Lebergewebe Acetessigsäure und auch Aceton zum Verschwinden bringen kann und späterhin unsere Untersuchungen auch auf andere Organe ausgedehnt.

Wir wandten bei unseren Versuchen teils Organe von Hunden, teils solche von Rindern und Schweinen an. Mit wenigen, unten

---

[1]) L. C. Schwarz, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 40. 185—186 (1898); Geelmuyden, Untersuchungen über Acetonkörper. Skandin. Arch. f. Physiologie 11, 114—115 (1900).

[2]) Schwarz, l. c. Geelmuyden, Über Aceton als Stoffwechselprodukt. Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 431 (1897). Müller, Sitzungsber. d. physik.-mediz. Gesellsch. in Würzburg 1898, S. 2—6.

[3]) L. Pollak, Über die Abspaltung von Aceton aus acetessigsauren Salzen durch Organauszüge und Eiweißkörper. Diese Beiträge 10, 232 (1907).

[4]) G. Embden und L. Lattes, Diese Beiträge, dieser Band, S. 327.

näher zu besprechenden Ausnahmen kamen die Organe so frisch wie möglich zur Verarbeitung, Hundeorgane sofort nach Tötung des Tieres, diejenigen von Schlachthaustieren so rasch, als es die ziemlich erhebliche Entfernung des Instituts vom Schlachthaus gestattete.

Die Organe wurden mit der Fleischhackmaschine möglichst gut zerhackt, kleine Organe wie Milz und Niere vom Hunde, mit dem Wiegemesser. Der gewonnene Organbrei wurde teils mit Rinderblut, teils mit physiologischer Kochsalzlösung in bestimmtem Verhältnis versetzt und zu gleichen, aliquoten Teilen dieser Mischung die gleiche Menge einer möglichst neutral reagierenden Lösung von acetessigsaurem Natron hinzugefügt.

Ein Teil wurde sofort mit der gleichen Menge Wasser und der doppelten Menge Salzsäure von 2 Proz. und Quecksilberchloridlösung von 5 Proz. nach Schenck gefällt, während einer bestimmten Zeit in der Kälte aufbewahrt, und in dem nach dieser Zeit gewonnenen Filtrate eine Acetonbestimmung nach Messinger-Huppert vorgenommen.

Die anderen, gleich großen Teile der Mischung wurden in sterilisierte Pulverflaschen, die mit dicht schließenden Glasstopfen versehen waren, überführt. Sie verblieben unter häufigem Schütteln verschieden lange in einem Wasserbade, dessen Temperatur auf 40° C gehalten wurde. Die Zeit des Aufenthaltes im Wasserbade schwankte zwischen 15 und 90 Minuten. Nach dieser Zeit wurden die dem Wasserbade entnommenen Flaschen in verschlossenem Zustande auf 5 bis 15 Minuten in Eis gekühlt, um Acetonverluste beim Öffnen der Flaschen zu vermeiden. Dann wurden die Organgemische genau in der gleichen Weise wie der sofort angesetzte Anteil weiter verarbeitet; insbesondere wurde darauf Bedacht genommen, daß von der Fällung der Gemische mit Salzsäure und Sublimat bis zur Filtration bei den einzelnen Bestimmungen desselben Versuches stets dieselbe Zeit verging.

Die Bestimmungen nach Messinger-Huppert wurden stets an möglichst großen, innerhalb der einzelnen Versuche stets gleichen, aliquoten Teilen des Filtrates angestellt, in den meisten Versuchen an 500 ccm.

Die gewonnenen Werte wurden auf Acetessigsäure und auf die gesamte, nach Fällung mit Salzsäure und Sublimat vorhandene Flüssigkeitsmenge umgerechnet. Hierbei wurde der Eiweißniederschlag vernachlässigt.

In allen späteren Versuchen wurde das acetessigsaure Natron aus der Pipette dem Inhalt der einzelnen Flaschen zugefügt. Diese Flüssigkeitsmenge war so gering, daß wir sie bei der Berechnung der Acetessigsäuremenge auf die Gesamtflüssigkeit nicht zu berücksichtigen brauchten.

Die Acetessigsäure wurde aus Acetessigester, der durch Schütteln mit Baryumcarbonat in Wasser von sauren Beimengungen befreit war, dargestellt. Die Verseifung geschah durch Normal-Natronlauge in geringem Überschuß. Nach 48stündigem Stehen im Eisschrank wurden unverseifte Reste von Acetessigester durch öfteres Schütteln mit Äther entfernt, und die Flüssigkeit mit $^1/_{10}$-Normalsalzsäure genau neutralisiert.

Nunmehr wurde der Äther, sowie der bei der Verseifung gebildete Alkohol durch Destillation unter möglichst geringem Druck entfernt. Die Temperatur des Heizwassers überstieg 29 bis 32° nicht. Hierbei mußte

gleichzeitig etwa vorhandenes Aceton beseitigt werden[1]). Die so gewonnene von Acetessigester, Äther, Alkohol und Aceton freie, neutral reagierende Lösung wurde bei möglichst niederer Temperatur aufbewahrt und bildete die Stammlösung der bei den einzelnen Versuchen benutzten Verdünnungen. Die Verdünnung geschah mit Kochsalzlösung von 0,85 Proz. Bald stellte es sich heraus, daß bei längerem Stehen im Eisschranke die Lösungen von acetessigsaurem Natron augenscheinlich für unsere Versuche unbrauchbar wurden, ohne daß sich mit einfachen analytischen Mitteln eine Veränderung nachweisen ließ. Wir haben daher im weiteren Verlaufe der Arbeit stets möglichst frisch bereitete Acetessigsäure benutzt. Der Gehalt der Lösung an Acetessigsäure wurde kurze Zeit vor dem Ansetzen des Versuches durch Destillation eines gemessenen Teiles bei salzsaurer Reaktion und Titration des in das Destillat übergehenden Acetons bestimmt. Danach wurden die den Organgemischen zuzufügenden Quantitäten berechnet. Die in den sofort angesetzten Versuchen ermittelten Acetonwerte stimmten mit den bei der direkten Bestimmung an der Lösung gefundenen ausreichend überein.

Wir gingen vorerst der oben erwähnten Beobachtung nach und untersuchten die Einwirkung von Leberbrei, dem Blut oder Kochsalzlösung von 0,85 Proz. zugesetzt war, auf acetessigsaures Natron.

Die Versuche sind in umstehender Tabelle I zusammgestellt. Die Versuche 1 bis 7b wurden mit Mischungen von Leberbrei und Rinderblut, die Versuche 8 bis 15 mit Mischungen von Leberbrei und Kochsalzlösung angestellt. Aus Kolonne 2 geht die Menge der Lebermischung und der Grad der Verdünnung der Leber durch Blut bzw. Kochsalzlösung hervor. Kolonne 3 gibt die in dem sofort angesetzten Anteil des Organbreies aus der Bestimmung nach Messinger-Huppert berechnete Menge Acetessigsäure in mg an, während aus den Kolonnen 4 bis 7 die ebenso ermittelten Mengen der Acetessigsäure nach verschieden langem Stehen des Organbreies bei 40° C ersichtlich sind. In Kolonne 8 und 9 ist die Abnahme der Acetessigsäure für den längsten Aufenthalt im Wasserbade in mg und Prozenten berechnet.

Wie man sieht, findet in diesen Versuchen eine zum großen Teil ganz bedeutende Abnahme der Acetessigsäure statt. Diese Abnahme schwankt bei den mit 150 ccm Lebermischung ausgeführten Versuchen, wenn wir von dem gleich zu besprechenden Versuch 7b absehen, zwischen 14 mg (Versuch 9) und 66 mg (Versuch 3) und zwischen 13,6 Proz. (Versuch 13) und 64,0 Proz. (Versuch 1).

---

[1]) Siehe Embden u. Schliep, Über getrennte Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure. Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels 1907, Nr. 7 u. 8.

Tabelle I.

1	2	3	4	5
Nummer	Versuchsanordnung	Sofort Acetessigsäure in mg	Nach 15 Min. Acetessigsäure in mg	Nach 30 Min. Acetessigsäure in mg
1	150 ccm Blut-Lebermischung (2 : 1)	25	—	12
2	150 ccm Blut-Lebermischung (3 : 1)	45	22	19
3	350 ccm Blut-Lebermischung (3 : 1)	125	—	56 [54]
4a	150 ccm Blut-Lebermischung (3 : 1)	103	—	80 (nach 25 Min.)
4b	Dasselbe mit O_2 - Durchleitung	103	—	86 (nach 25 Min.)
5a	150 ccm Blut-Lebermischung (3,7 : 1)	55	—	—
5b	Dasselbe mit O_2 - Durchleitung	55	—	34
6	125 ccm Blut-Lebermischung (4 : 1)	115	86 (nach 20 Min.)	85 (nach 40 Min.)
7a	150 ccm Blut-Lebermischung (2 : 1)	94	77 (nach 15 Min.)	[88?] (nach 30 Min.)
7b	Dieselbe Mischung nach 24-stündigem Stehen im Eisschrank	95	—	95
8	150 ccm physiologische Kochsalzlösung - Lebermischung (2 : 1)	117	88	87
9	150 ccm physiologische Kochsalzlösung - Rinderlebermischung (2 : 1)	100	—	86
10	150 ccm physiologische Kochsalzlösung - Lebermischung (2 : 1)	94	—	69
11	150 ccm physiologische Kochsalzlösung - Lebermischung (2 : 1)	61	—	29
12	150 ccm physiologische Kochsalzlösung - Lebermischung (1 : 1)	89	70	60
13	150 ccm physiologische Kochsalzlösung - Lebermischung (4 : 1)	110	—	99
14	150 ccm physiologische Kochsalzlösung + 40 g Leberbrei	170	—	129
15	700 ccm physiologische Kochsalzlösung + 150 g Leberbrei	482	—	—

Tabelle I.

6	7	8	9	10
Nach 60 Min. Acetessigsäure in mg	Nach 90 Min. Acetessigsäure in mg	Abnahme der Acetessigsäure in mg	in Proz. d. Anfangswertes	Bemerkungen
9	9	16	64,0	Hundelebern.
20	—	25	55,6	—
59 [38]	—	66	52,8	Gesamtaceton. Aceton aus Acetessigsäure.
73 (nach 50 Min.)	—	30	29,1	—
76 (nach 50 Min.)	—	27	26,2	—
34	—	21	38,2	—
36	—	19	34,5	—
69 (nach 80 Min.)	—	46	40,0	—
73 (nach 60 Min.)	—	21	22,3	Rinderleber.
96	—	0	0	"
80	—	37	31,6	—
—	—	14	14,0	—
50	—	44	46,8	—
27	29	32	52,4	Die Leber wird vor dem Zerkleinern so lange mit NaCl-Lösung durchgespült, bis die ausfließende Flüssigkeit nur noch schwach rosa gefärbt ist.
51	—	38	42,7	Dasselbe.
95	—	15	13,6	Vor Ansetzen des Versuches wird die Leber wie in den beiden vorigen Versuchen durchgespült und außerdem während 1/2 Stunde in Eis liegen gelassen.
114	—	56	32,9	—
257	—	225	46,6	—

Der sich dem Nachweise entziehende Teil der Acetessigsäure ist jedenfalls kein Aceton, da ja in diesem Falle eine Abnahme der Titrationswerte nach Messinger-Huppert nicht stattfinden könnte.

Das Verschwinden der Acetessigsäure findet außerordentlich rasch statt. Schon nach 15 bis 20 Minuten (Kol. 4) erreicht der Verlust sehr erhebliche Werte. Die anfangs sehr steile Kurve der Abnahme wird wenigstens in vielen Versuchen bald flacher. Wir haben im allgemeinen unsere Versuche nicht über 60 Minuten ausgedehnt, um störende Nebenwirkungen, namentlich bakterieller Art, auszuschalten.

In den zwei Versuchen, wo die Versuchsdauer bis auf 90 Minuten verlängert wurde, ist die Abnahme gegenüber derjenigen nach 60 Minuten nicht stärker geworden.

Zwei Versuche (4 und 5) wurden derart angestellt, daß während des Aufenthaltes bei 40° durch einen Teil der Flaschen Sauerstoff durchgeleitet wurde, während die übrigen verschlossen blieben. Durch aufgesetzte Rückflußkühler wurden Verluste an etwa auftretendem Aceton verhindert, wovon wir uns dadurch überzeugten, daß in vorgelegten Waschflaschen mit kaltem Wasser sich am Ende des Versuches keine Spur jodbindender Substanz nachweisen ließ. Ein sicherer Einfluß der Sauerstoffdurchleitung auf den Umfang der Acetessigsäureabnahme war nicht erkennbar. Die Abnahme war in den Flaschen ohne Sauerstoffdurchleitung zum mindesten nicht geringer, als in denjenigen mit Sauerstoffdurchleitung.

Der Umfang und Verlauf der Reaktion unterscheidet sich in den Versuchen mit Blutlebergemischen und solchen mit Kochsalzlösung und Leber nicht wesentlich. Auch dann, wenn man die Leber von der Pfortader aus mit Kochsalzlösung möglichst blutfrei spült, hat sie anscheinend durchaus nicht an Wirksamkeit verloren (Versuch 11).

Einer besonderen Besprechung bedarf noch Versuch 7b. Hier hatten wir dasselbe Gemisch aus Rinderblut und Rinderleber, das für Versuch 7a angewendet worden war, und eine sehr deutliche Abnahme der Acetessigsäure herbeigeführt hatte, 24 Stunden im Eisschrank stehen lassen. Der am nächsten Tage angesetzte Versuch, bei dem die gleiche Acetessigsäuremenge wie in Versuch 7a angewendet wurde, verlief völlig negativ. Es hatte also der 24stündige Aufenthalt im Eisschrank genügt, um die Acetessigsäure-zerstörende Kraft der Leber völlig zu vernichten.

Man wird daher bei derartigen Versuchen nur mit ganz frischen Organen arbeiten dürfen.

Wir wollen noch besonders hervorheben, daß ein quantitativer Vergleich der Abnahme in den verschiedenen Versuchen deswegen nicht streng durchzuführen ist, weil eine Reihe von Versuchsbedingungen, so namentlich das Verhältnis von Blut bzw. Kochsalzlösung zur Leber, der Ernährungszustand der Versuchstiere und ferner auch die Menge der zugesetzten Acetessigsäure schwankten.

Die Größe des Acetessigsäurezusatzes ist aber auf den Umfang des Verschwindens der Acetessigsäure von wesentlichem Einfluß, wie aus dem in Tabelle II wiedergegebenen Versuch 16 hervorgeht.

Tabelle II, Versuch 16.

1	2	3	4	5	6	7
	Versuchsanordnung	Sofort Acetessigsäure in mg	Versuchsanordnung	Nach 45 Min. Acetessigsäure in mg	Abnahme in mg	Abnahme in Proz. des Anfangswertes
a	150 ccm Rinderblut + 30 ccm Acetessigsäurelösung	150	150 ccm Blut-Lebermisch. + 30 ccm Acetessigsäure	111	39	26,0
b	150 ccm Rinderblut + 20 ccm Acetessigsäurelösung	102	—	—	—	—
b	150 ccm Blut-Lebermisch. + 20 ccm Acetessigsäurelösung	103	150 ccm Blut-Lebermisch. + 20 ccm Acetessigsäure	74	29	28,1
c	150 ccm Rinderblut + 10 ccm Acetessigsäurelösung	48	150 ccm Blut-Lebermisch. + 10 ccm Acetessigsäure	32	16	33,3
d	150 ccm Rinderblut + 5 ccm Acetessigsäurelösung	24	150 ccm Blut-Lebermisch. + 5 ccm Acetessigsäure	10	14	58,3

Überall gelangten gleiche Mengen des gleichen Blut-Lebergemisches zur Anwendung. In Versuch a wurden 30 ccm, in den Versuchen b bis d 20, 10 und 5 ccm derselben Lösung von acetessigsaurem Natron zugefügt und alle Flüssigkeiten durch entsprechenden Zusatz von Kochsalzlösung auf gleiche Volumina gebracht. Hier ist die Abnahme bei dem stärksten Acetessigsäuregehalt (Versuch a) in mg zwar am größten, in Prozenten der zugesetzten Acetessig-

säuremenge aber am geringsten, während bei dem geringsten Acetessigsäurezusatz (Versuch d) das Umgekehrte der Fall ist. Die beiden dazwischen liegenden Versuche b und c zeigen ein völlig dementsprechendes Verhalten.

Die oben angegebenen Werte für die Abnahme der Acetessigsäure sind in der Weise berechnet, daß wir die am Ende des Versuches vorhandene Menge an flüchtiger jodoformbildender Substanz auf Acetessigsäure bezogen. Ist die Annahme, daß am Ende des Versuches alle bei saurer Reaktion flüchtige jodoformbildende Substanz noch als Acetessigsäure vorhanden war, berechtigt? Wir haben diese Frage bisher nur in einem einzigen Versuch durch gleichzeitige Acetessigsäurebestimmung nach Embden und Schliep zu entscheiden versucht (Versuch 3, eingeklammerte Zahlen). In diesem Versuche ist nach einer halben Stunde, wo die Abnahme an flüchtiger, jodoformbildender Substanz bereits abgeschlossen ist, Aceton in meßbarer Menge nicht vorhanden, während nach einer Stunde eine sehr deutlich nachweisbare Acetonmenge aufgetreten ist. Wir unterlassen es, diesem Versuche irgend eine Deutung zu geben, bevor uns weiteres Versuchsmaterial vorliegt.

Nachdem durch die eben geschilderten Versuche der Nachweis geliefert war, daß der Leber eine mächtige Acetessigsäure-zerstörende Wirkung zukommt, haben wir nunmehr zunächst untersucht, ob unter den gleichen Versuchsbedingungen auch zugefügtes Aceton von der Leber zum Verschwinden gebracht wird. Die auf diesen Gegenstand gerichteten Versuche sind in Tabelle III, deren Anordnung ganz dieselbe ist wie Tabelle I, wiedergegeben.

Man sieht aus Kolonne 6 und 7, daß auch hier eine ganz unverkennbare Abnahme des Acetons stattgefunden hat. Zum direkten Vergleiche mit den früheren Acetessigsäureversuchen lassen sich die Zahlen der Kolonne 6 nicht ohne weiteres verwerten, weil sie auf das kleinere Molekül des Acetons berechnet sind. Dagegen gestatten die Prozentzahlen in Kolonne 7 einen unmittelbaren Vergleich. Man sieht, daß das Maximum der prozentischen Abnahme (25 Proz., Versuch 17) weit hinter der in der Mehrzahl der Acetessigsäureversuche beobachteten Abnahme zurückbleibt. In vier von den sieben Versuchen der Tabelle III (Versuch 18, 20, 21 und 23) bleibt der prozentische Abnahmewert hinter den früher beobachteten Minimalwerten zurück.

Wir möchten noch darauf hinweisen, daß anscheinend auch der Verlauf der Abnahmekurve ein weniger steiler ist als bei den Acetessigsäureversuchen.

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7	
Nummer	Versuchsanordnung	Sofort Aceton in mg	Nach 15 Minuten Aceton in mg	Nach 60 Minuten Aceton in mg	Abnahme des Acetons		Bemerkungen
					in mg	in Proz. des Anfangswertes	
17	150 g Leberbrei + Kochsalzlösung + Acetonlösung	44	41 (nach 30 Min.)	33	11	25,0	Hundeleber mit Rinderblut und Leucin durchblutet. Danach gründliche Durchspülung der Leber mit NaCl-Lösg. Vor Beginn des Versuches bleibt die Leber 1/2 Stunde in Eis liegen.
18	19 g Leberbrei + 100 ccm physiologische Kochsalzlösung + Acetonlösung	52	—	46	6	11,5	—
19	50 g Leberbrei + 100 ccm Blut + 5 ccm 1 proz. Acetonlösung	37	35	31	6	16,2	—
20	Dasselbe	35	34	33	2	5,7	—
21	"	28	26	25	3	10,7	—
22	"	44	40	37	7	16,0	—
23	"	39	36	34	5	12,8	—

Im ganzen kommen wir dahin: Die Leber vermag wie Acetessigsäure, so auch Aceton zu zerstören, die letztere Substanz aber in weit geringerem Maße.

Bevor wir nunmehr unsere Versuche auch auf andere parenchymatöse Organe ausdehnten, untersuchten wir, ob auch dem Blute die Fähigkeit der Acetessigsäure- und Acetonzerstörung zukommt.

Aus den Versuchen 24 und 25 (nebenstehende Tabelle IV), in denen die angewendete Blutmenge mehr als das Doppelte bzw. das Doppelte der früheren Blutlebermischungen beträgt, ist eine geringe, aber namentlich im Versuch 24 unverkennbare Abnahme ersichtlich. In diesen beiden Versuchen wurden neben den Bestimmungen nach Messinger-Huppert auch Acetessigsäurebestimmungen angestellt. In beiden Fällen trat eine sehr deutliche Abnahme des Acetons aus Acetessigsäure auf oder mit anderen Worten: es hatten sich erhebliche Acetonmengen aus der Acetessigsäure gebildet. Im Versuch 25 war übrigens von vornherein schon etwas Aceton vorhanden.

Aus den Versuchen 26, 27, 28, die mit Aceton angestellt wurden, geht hervor, daß das Blut anscheinend unter den gewählten Versuchsbedingungen ohne jeden oder doch nur von sehr geringem Einfluß auf das Aceton ist.

Von anderen Organen wurden die Niere, die Muskulatur, die Milz und in einem Versuch auch die Lunge untersucht. Die Nierenversuche sind in Tabelle V (a. S. 344), Versuch 29 bis 36, zu finden. In den Versuchen 29 bis 31 kamen Hundenieren (in Versuch 31 solche von einem phlorizin-vergifteten Hunde) zur Verwendung, in den Versuchen 32 bis 35 frisch aus dem Schlachthaus bezogene Schweinenieren, in Versuch 36 solche, die in einem Metzgerladen als „frisch“ gekauft worden waren. In den Versuchen 29 bis 35 ist überall eine deutliche, zum Teil recht beträchtliche Abnahme der Acetessigsäure eingetreten. Die absoluten Abnahmen schwanken zwischen 9 mg (Versuch 29) und 28 mg (Versuch 32), die prozentischen zwischen 9,3 Proz. (Versuch 29) und 34,8 Proz. (Versuch 31).

Da die Verdünnung des Nierenbreis mit Blut bzw. mit Kochsalzlösung in diesen Fällen meist eine stärkere ist als in den Leberversuchen, so ist ein quantitativer Vergleich der Nieren- mit der Lebermischung einstweilen nicht möglich.

Versuch 36 zeigt wiederum, daß für das Gelingen der Versuche die völlige Frische der Organe Vorbedingung ist.

Tabelle IV.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nummer	Versuchsanordnung	Sofort in mg	Nach 15 Min. in mg	Nach 30 Min. in mg	Nach 60 Min. in mg	Nach 90 Min. in mg	Abnahme in mg	Abnahme in Proz. des Anfangswertes	Bemerkungen
	Acetessigsäure:								
24	350 ccm Blut + acetessigsaures Natrium	112	—	110	103	95	17	15,1	Gesamtaceton als Acetessigsäure.
		110	—	97	78	64	46	41,8	Acetessigsäure.
25	300 ccm Blut + acetessigsaures Natrium	96	—	91	91	—	5	5,2	Dasselbe
		84	—	84	73	—	11	13,1	"
	Aceton:								
26	150 ccm Rinderblut + 5 ccm 1 proz. Acetonlösung	35	—	—	35	—	0	0	—
27	Dasselbe	43	42	—	41	—	2	4,6	—
28	Dasselbe	38	38	—	38	—	0	0	—

Tabelle V.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nummer	Versuchsanordnung	Sofort Acetessigsäure in mg	Nach 15 Minuten Acetessigsäure in mg	Nach 30 Minuten Acetessigsäure in mg	Nach 60 Minuten Acetessigsäure in mg	Abnahme		Bemerkungen
						in mg	in Proz. des Anfangswertes	
29	65 ccm Blut-Nierenmischung (3,3:1)	96	—	87	—	9	9,3	Hundenieren.
30	65 ccm Blut-Nierenmisch. (3,3:1)	87	—	65	—	22	25,2	—
31	60 ccm physiologischer Kochsalzlösung-Nierenmischung (2,86:1)	66	—	43 (nach 45 Min.)	—	23	34,8	Nieren eines Phloridzinhundes.
32	100 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 25 g Nierenbrei	134	107	[112] (nach 30 Min.)	106	28	20,8	Schweinenieren, frisch geschlachtet aus dem Schlachthause bezogen.
33	100 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 20 g Nierenbrei	102	—	87	78	24	23,5	"
34	Dasselbe	84	—	82	69	15	17,8	"
35	Dasselbe	116	—	107	89	27	23,3	"
36	Dasselbe	101	—	101 (nach 40 Min.)	101 (nach 80 Min.)	0	0	Aus einem Laden bezogene nicht frische Nieren.

Die Versuche an Muskeln, an der Lunge und der Milz (Versuch 37 bis 43) sind in umstehender Tabelle VI vereinigt.

Überall, mit Ausnahme der Lungenversuche, finden wir eine Abnahme; die Abnahme ist im ersten Versuch der Tabelle allerdings so gering, daß sie fast innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung liegt. In den übrigen Versuchen ist sie aber unverkennbar.

Der Umstand, daß auch diese Versuche mit Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung mindestens ebenso gut gelangen, wie die mit Blutzusatz, läßt darauf schließen, daß es sich hier keineswegs um eine bloße Wirkung des zugefügten bzw. in den Organen befindlichen Blutes handelte.

Auf den bisher vereinzelten Lungenversuch möchten wir keinen Wert legen, sondern teilen ihn nur der Vollständigkeit halber mit.

Die weiteren Einzelheiten der Versuchsanordnung und der Resultate sind aus der Tabelle ersichtlich.

In aller Kürze sei noch darauf hingewiesen, daß Versuche mit Preßsäften aus Leber und Nieren bisher zu einem positiven Ergebnis nicht geführt haben, so wahrscheinlich die fermentative Natur des in Frage kommenden Prozesses auch sein mag.

Das wesentlichste Ergebnis unserer bisherigen Versuche ist, daß lebensfrischer Organbrei Acetessigsäure in ganz bedeutendem Umfange, Aceton in geringerem zum Verschwinden zu bringen vermag.

Die biologische Bedeutung unserer Beobachtungen wird sich erst dann klar übersehen lassen, wenn der chemische Prozeß, der sich bei dem Verschwinden der Acetessigsäure unter der Einwirkung von lebensfrischen Organen abspielt, aufgeklärt sein wird.

Dann wird sich auch erst übersehen lassen, ob das Verschwinden des Acetons in engem Zusammenhange mit demjenigen der Acetessigsäure steht oder nicht. Immerhin möchten wir schon jetzt die Vermutung äußern, daß das Verschwinden der Acetessigsäure unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen einer auch in den lebenden Organen vorhandenen physiologischen Funktion entspricht. Am nächsten scheint uns die Annahme zu liegen, daß die zerstörende Wirkung von Organbrei auf Acetessigsäure als der Ausdruck eines Abbauvorganges anzusehen ist. Hiermit würde auch im besten Einklange stehen, daß genau so, wie in den lebenden Organismus eingeführte Acetessigsäure weit vollständiger verbrannt wird als zugefügtes Aceton, auch in unseren Versuchen an lebensfrischen Organen die zerstörende Wirkung auf Acetessigsäure weit ausgeprägter war, als jene auf Aceton.

Tabelle VI.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nummer	Versuchsanordnung	Sofort Acetessigsäure in mg	Nach 15 Minuten Acetessigsäure in mg	Nach 30 Minuten Acetessigsäure in mg	Nach 60 Minuten Acetessigsäure in mg	Abnahme		Bemerkungen
						in mg	in Proz. des Anfangswertes	
37	150 ccm Blut-Muskelbreimisch. (3 : 1)	45	—	43	43	2	4,4	Sämtliche Organe dieser Versuche stammten vom Hunde.
38	100 ccm Blut + 35 g Muskelbrei (2,8 : 1)	57	—	57	45	12	21,0	
39	100 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 50 g Muskelbrei (2 : 1)	50	—	—	38 (nach 45 Min.)	12	24,0	
40	125 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 25 g Muskelbrei (5 : 1)	107	101	—	89 (nach 60 Min.)	18	16,8	
41	100 ccm Blut + 20 g Lungenbrei (5 : 1)	75	—	—	75	0	0	
42	100 ccm Blut + Milzbrei (10 : 1)	73	—	—	67	6	8,2	
43	50 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 5 g Milzbrei (10 : 1)	52	—	—	44	8	15,4	

Welcher Art die bei diesem Abbau auftretenden intermediären Stoffwechselprodukte sind, darüber geben unsere Versuche keinen Aufschluß. Der Umstand, daß Sauerstoffdurchleitung auf den Umfang der Acetessigsäurezerstörung ohne Einfluß ist, scheint darauf hinzudeuten, daß es sich nicht um einen oxydativen Abbauvorgang handelt. Die rein chemischen Beobachtungen an der Acetessigsäure und nicht minder die biologischen Erfahrungen über das Auftreten von Essigsäure im Harn unter normalen und pathologischen Verhältnissen weisen auf die Möglichkeit hin, daß es sich in unseren Versuchen um eine, der bekannten Säurespaltung des Acetessigesters entsprechende Essigsäurebildung handle.

Eine Bildung von Essigsäure während der Versuchsdauer konnte bisher von uns nicht nachgewiesen werden. Jedoch halten wir es für keineswegs ausgeschlossen, daß der Nachweis bei verbesserter Methodik gelingen wird. Die Essigsäurebildung aus Acetessigsäure würde ein vollkommenes Analogon zu der von Knoop für aromatische Fettsäuren und von verschiedenen Autoren in Gemeinschaft mit Embden für aliphatische Fettsäuren erwiesene Spaltung zwischen α- und β-C-Atom darstellen.

Die Acetessigsäure ist mit Sicherheit als ein Abbauprodukt einer ganzen Reihe von Fett- und Eiweißabkömmlingen erwiesen und durch Nachweis der Bildung der Essigsäure aus Acetessigsäure würde daher die Entstehung der Essigsäure im Organismus in sehr klare Beziehungen zum Fett- und Eiweißabbau gebracht werden. Natürlich werden unsere weiteren Versuche sich keineswegs auf das Verhalten der Essigsäure zu beschränken haben, sondern sich auch nach anderen Richtungen, die uns in einem Teil unserer Versuche angedeutet zu sein scheinen, erstrecken müssen.

Die Fähigkeit der Acetessigsäureumwandlung ist an kein bestimmtes Organ gebunden, wenn auch quantitative Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener Organe vorhanden sind.

XXVII.

Über das Verhalten der optisch-isomeren Leucine in der Leber.

Von **Gustav Embden.**

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut der städtischen Krankenanstalten zu Frankfurt a. M.)

Gelegentlich einer gemeinschaftlich mit Hans Engel[1]) unternommenen Untersuchung über die Acetessigsäurebildung in der Leber wiederholten wir auch die früheren Versuche mit Zusatz von Leucin zum Durchblutungsblute.

Bei dem ersten dieser neuen Versuche wurden 2 g natürliches, aus mit Säure gespaltenem technischen Caseïn durch fraktionierte Kristallisation gewonnenes Leucin dem Durchblutungsblute zugefügt; die Dauer der Durchblutung betrug 50 Minuten. Der Umfang der „Gesamtacetonbildung“ [2]) (präformiertes Aceton + Aceton aus Acetessigsäure) war in diesem Versuche (Versuch 1 der Tabelle I) nicht größer als in unseren früheren Normalversuchen.

Der Versuch wurde mit einem anderen, aus der gleichen Caseïnspaltung gewonnenen Präparat wiederholt. Die Durchblutungszeit betrug hier 60 Minuten. Auch in diesem Falle war eine vermehrte Acetonbildung unter dem Einflusse des Leucins nicht eingetreten.

Die Elementaranalyse eines der verwendeten Präparate gab für C, H und N mit den für Leucin berechneten völlig übereinstimmende Werte; die spezifische Drehung war um ein geringes zu hoch.

---

[1]) G. Embden und H. Engel, Diese Beiträge, dieser Band, S. 323.

[2]) Es wird in dieser Arbeit bequemlichkeitshalber überall von „Aceton“-Bildung gesprochen werden, wiewohl der überwiegende Anteil der flüchtigen, jodoformbildenden Substanz im Blute als Acetessigsäure vorhanden ist.

Für zwei weitere Leucinversuche verwendeten wir nunmehr ein synthetisch gewonnenes, von Kahlbaum käuflich bezogenes Präparat. Beide Versuche (Tabelle II, Versuche 11 und 12) fielen durchaus positiv aus. In Versuch 11 betrug die Acetonbildung pro Liter bei einer Durchblutungsdauer von 90 Minuten trotz sehr mangelhaft gelungener Durchblutung 55 mg, in Versuch 12 bei einer Durchblutungsdauer von 70 Minuten 82 mg (d. h. annähernd das Zwei- bzw. Dreifache der bisher beobachteten maximalen Normalwerte [1]).

Wodurch war nun das verschiedene Verhalten des Caseïnleucins und des synthetischen Leucins in bezug auf die Acetonbildung bei der Durchblutung bedingt?

Daß es sich hier um einen bloß technisch bedingten Versuchsfehler handle, schien mir bei der Einheitlichkeit der sämtlichen früheren Versuchsresultate von vornherein recht unwahrscheinlich.

Es war demnach vor allem geboten, die Versuche an Caseïnleucin und an synthetischem Leucin unter möglichst gleichartigen Bedingungen zu wiederholen.

Zu dem Zwecke wurde zunächst eine größere Menge völlig reinen Leucins aus Caseïn (dasselbe Präparat diente auch für eine Reihe weiter unten zu schildernder Versuche) dargestellt. Das Rohprodukt war von vornherein durch fraktionierte Kristallisation von Tyrosin fast völlig befreit, es wurde in nicht zu wenig Wasser gelöst und die wässerige Lösung nach Entfärbung mit Tierkohle mit Kupfercarbonat gekocht.

Ein großer Teil der Kupferverbindung fiel sofort aus. Nach dem Erkalten wurde der Niederschlag von der tiefblauen Flüssigkeit abgesaugt, gründlich mit kaltem Wasser, Methylalkohol, Äthylalkohol und schließlich mit Äther gewaschen. (Hervorgehoben sei, daß bei der gewählten Konzentration der Lösung der Kupferniederschlag von vornherein stets völlig frei von Isoleucinkupfer war, während die überstehende Flüssigkeit allem Anscheine nach sehr viel von dieser Verbindung enthielt.)

Der Kupferniederschlag wurde in sehr viel heißem Wasser suspendiert, durch Schwefelwasserstoff in der Siedehitze zerlegt, nach dem Wegkochen des überschüssigen Schwefelwasserstoffs heiß filtriert und die resultierende, fast ungefärbte Flüssigkeit bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt. Das nach dem Erkalten ausgeschiedene Leucin wurde nochmals aus Wasser umkristallisiert.

---

[1]) Diese beiden Versuche sind bereits in der Arbeit von Embden und Engel veröffentlicht.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6
Nr. des Versuchs	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Dauer der Durchblutung Min.	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
1	2 g natürliches Leucin in 100 ccm Kochsalzlösung von 0,85 Proz.	50	20	34	
2	2 g natürliches Leucin in 100 ccm Kochsalzlösung	60	26	44	
3	2 g natürliches Leucin in 100 ccm Kochsalzlösung	50	14	24	Zu diesem und dem Versuch 7 (Tab. II) dasselbe Blut.
4	Dasselbe	50	31	53	Nach 30 Minuten Acetonbildung pro Liter 25 mg.
5	Dasselbe	50	27	46	Zu diesem Versuch dasselbe Blut wie zu Versuch 9. Nach 30 Minuten Acetonbildung pro Liter 16 mg.
6	Dasselbe	50	30	51	Nach 30 Minuten Acetonbildung pro Liter 25 mg.

Für die folgenden Versuche mit Caseïnleucin (Tabelle I, Versuche 3 bis 6) diente ein und dasselbe Präparat.

Die Dauer der Durchblutung betrug in diesen 4 Versuchen 50 Minuten.

Die Acetonbildung während dieser Zeit schwankt zwischen 14 mg (Versuch 3) und 31 mg (Versuch 4) pro Liter Durchblutungsblut [1]), d. h. sie übertrifft die Acetonbildung in Leerversuchen entweder gar nicht, oder doch nur um ein ganz geringes.

Zwei in der ganz gleichen Weise angestellte Versuche mit synthetisch gewonnenem Racemkörper (Tabelle II, Versuche 7 und 8) zeigten dagegen — ganz in Übereinstimmung mit den

[1]) Mehrfach (Versuche 4 und 6, Bemerkungen) wurden bereits nach ½ Stunde Blutproben (110 bis 120 ccm Blut) entnommen. Zu dieser Zeit war die Acetonbildung merklich geringer als nach 50 Minuten.

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6
Nr. des Versuchs	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Dauer der Durchblutung Min.	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
7	2 g synthetisches Leucin in 100 ccm Kochsalzlösung	50	70	119	Dasselbe Blut wie zu Versuch 3, Tab. I. Nach 30 Minuten Acetonbildung pro Liter 50 mg.
8	Dasselbe	50	88	150	Nach 30 Minuten Acetonbildung pro Liter 60 mg.
9	2 g racemisches Leucin aus natürlichem Leucin in 100 ccm Kochsalzlösung	50	46	78	Nach 30 Minuten Acetonbildung pro Liter 34 mg. Zu diesem und zu Versuch 5 dasselbe Blut.
10	Dasselbe	50	56	95	Nach 30 Minuten Acetonbildung pro Liter 37 mg.
11	2 g synthetisches Leucin in 100 ccm Kochsalzlösung	90	55	83	Während der ersten halben Stunde verlief die Durchblutung schlecht.
12	2 g synthetisches Leucin in 200 ccm Kochsalzlösung	70	82	148	

früher erwähnten Versuchen 11 und 12 — eine sehr stark vermehrte Acetonbildung.

Zweifellos bestand also in dem Verhalten des Caseïnleucins und des synthetischen Leucins in der Leber ein sehr wesentlicher Unterschied: Das Caseïnleucin bildete unter Umständen, unter denen sich das synthetische Leucin als kräftiger Acetonbildner erwies, kein Aceton.

Zur Erklärung dieses Unterschiedes mußte von vornherein hauptsächlich an zwei Möglichkeiten gedacht werden. Entweder bestand das Caseïnleucin ganz oder teilweise aus einem isomeren Leucin von besonderer chemischer Struktur, oder das differente Verhalten der beiden Leucinarten bei der Durchblutung war durch ihre verschiedenartigen physikalischen Eigenschaften bedingt.

Was zunächst die erste Möglichkeit betrifft, so sei hier nochmals hervorgehoben, daß das angewandte Präparat alle Eigenschaften des reinen Leucins hatte. Insbesondere war es sicher völlig frei von Isoleucin.

Ich habe mich — so wenig aussichtsreich ein solches Unternehmen von vornherein auch erschien — in ziemlich ausgedehnten, hier nicht näher zu schildernden Versuchen bemüht, aus isoleucinfreiem Caseïnleucin durch verschiedenartige Methoden der Fraktionierung Fraktionen von verschiedenen Eigenschaften zu gewinnen — ohne jeden Erfolg.

Ließen sich also einerseits Verschiedenheiten in dem chemischen Verhalten der beiden angewandten Leucinarten nicht auffinden, so konnte andererseits leicht gezeigt werden, daß ihr verschiedenes biologisches Verhalten in der Leber nur durch ihre sterischen Unterschiede hervorgerufen wird. Dasselbe Leucinpräparat aus Caseïn, das unter den oben geschilderten Versuchsbedingungen kein Aceton bildete, bildete nach einfacher Racemisierung unter ganz den gleichen Bedingungen Aceton [1]).

Die Versuche finden sich in Tabelle II (Versuche 9 und 10). Die Acetonbildung betrug 46 bzw. 56 mg pro Liter Blut.

Da sich das racemische Leucin von dem natürlichen l-Leucin nur dadurch unterscheidet, daß es zur Hälfte aus d-Leucin besteht, lag es nahe, nunmehr auch die Einwirkung der letztgenannten Substanz auf die Acetonbildung in der Leber zu prüfen.

Versuch 13. Durchblutung einer kleinen Leber mit 1,5 g d-Leucin in 100 ccm Kochsalzlösung. Dauer 50 Minuten. Acetonbildung pro Liter: 66 mg; im ganzen: 112 mg; nach 30 Minuten Acetonbildung pro Liter: 48 mg.

Der Versuch zeigt, daß auch das d-Leucin ein ausgezeichneter Acetonbildner ist. Besonders auszuführende Versuche werden festzustellen haben, ob es unter geeigneten Bedingungen kräftiger als der Racemkörper auf die Acetonbildung in der Leber einwirkt.

Die Tatsache, daß das d-l-Leucin und ebenso auch das d-Leucin in der isolierten Leber Aceton bilden unter Umständen, unter denen das natürliche l-Leucin Aceton nicht entstehen läßt, mag auf den ersten Blick befremdlich erscheinen. Wissen wir doch, daß bei Verabreichung von racemischen Aminosäuren an den Hund

---

[1]) Die Racemisierung wurde — in üblicher Weise — durch längeres (24stündiges) Erhitzen mit Barytwasser auf 160° erreicht.

die unnatürliche Komponente weit schlechter ausgenutzt wird als die natürliche, und zum Teil im Harn wieder erscheint.

Auf Grund früherer Versuche sind wir ferner zu der Vorstellung gelangt, daß das Aceton — bzw. die Acetessigsäure — ein normales, beim Abbau des Leucins in der Leber intermediär auftretendes Stoffwechselprodukt ist.

In dem Auftreten von vermehrter Acetonbildung bei der Durchblutung mit Leucin wäre demnach jedenfalls ein Zeichen dafür zu erblicken, daß ein Abbau von Leucin erfolgt ist.

Dürfen wir umgekehrt aus dem Ausbleiben vermehrter Acetonbildung in den oben geschilderten Versuchen mit natürlichem Leucin schließen, daß das Leucin hier nicht abgebaut wurde?

Ein solcher Schluß ist gewiß nicht ohne weiteres statthaft. Es läßt sich nicht ausschließen, daß der Abbau auf einem anderen, nicht über die Acetessigsäure führenden Wege erfolgte.

Weit wahrscheinlicher erscheint mir allerdings eine andere Möglichkeit: Das Leucin wurde nicht abgebaut, sondern im Gegenteil, es wurde synthetisch verwendet.

Gelangt man doch mehr und mehr zu der Erkenntnis, daß der Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus aus ihren niedersten Spaltungsprodukten — eben den Aminosäuren — erfolgt oder doch erfolgen kann. Und weiß man doch, daß am Aufbau der Eiweißkörper — und auch der Peptide — nur die in der Natur vorkommende optisch-aktive Form der Aminosäuren beteiligt ist.

Ich will aber die eben angedeutete Vorstellung einer synthetischen Verwendung des natürlichen Leucins in der isolierten Leber an dieser Stelle um so weniger weiter entwickeln, als ich hoffe, sie auf einem anderen Wege als dem hier beschrittenen erweisen zu können.

Nur darauf möchte ich die Aufmerksamkeit lenken, daß eine solche Vorstellung mit dem Verhalten des d-l-Leucins und des d-Leucins in der Leber aufs beste vereinbar wäre.

Das unnatürliche d-Leucin, beziehungsweise die unnatürliche Komponente des d-l-Leucins, können synthetisch nicht verwandt werden. Die Leber weiß mit ihnen gleichsam nichts besseres anzufangen als sie als Brennmaterial zu benutzen, sie — unter intermediärer Acetessigsäurebildung — abzubauen.

Die geringere Ausnutzbarkeit der unnatürlichen Komponenten der Aminosäuren im Tierkörper ist dementsprechend vielleicht weniger durch ihre geringere Verbrennlichkeit, als durch ihre

mangelnde Fähigkeit, am Aufbau komplizierterer Aminosäureverbindungen teilzunehmen, bedingt.

Kann nun aber nicht das natürliche Leucin unter Acetessigsäurebildung in der Leber abgebaut werden?

Dafür sprachen namentlich früher von Embden, Salomon und Schmidt gemeinsam ausgeführte Versuche [1]).

In diesen Versuchen war allerdings die Menge des dem Durchblutungsblute zugefügten l-Leucins zumeist weit größer als 2 g und ferner betrug die Durchblutungszeit nicht, wie in den hier bisher mitgeteilten Versuchen, 50 Minuten, sondern 75 Minuten.

Es scheint nun, daß bei Anwendung von 2 g Leucin und einer Durchblutungszeit von 75 Minuten in der Tat bereits vermehrte Acetonbildung auftreten kann (Tabelle III, Versuch 14, Acetonbildung pro Liter 41 mg).

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6
Nr. des Versuchs	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Dauer der Durchblutung Min.	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
14	2 g natürliches Leucin in 100 ccm Kochsalzlösung	75	41	70	
15	6 g natürliches Leucin in 200 ccm Kochsalzlösung	75	62	112	Nach 50 Minuten Acetonbildung pro Liter 49 mg.
16	Dasselbe	75	61	110	

Die Acetonbildung wurde aber genau so stark, wie in den früher veröffentlichten Versuchen, als ich ähnliche Leucinmengen, wie in der Mehrzahl dieser Versuche, anwendete.

In den Versuchen 15 und 16 der Tabelle III wurde mit je 6 g desselben Leucinpräparates, das auch zu den Versuchen 3 bis 6 Verwendung fand, während 75 Minuten durchblutet. Die Acetonbildung betrug 62 beziehungsweise 61 mg pro Liter. In Versuch 14 war nach 50 Minuten eine Acetonbildung von 49 mg pro Liter eingetreten [2]).

[1]) Embden, Salomon und Schmidt, l. c.

[2]) Die Resultate der vorliegenden Untersuchung stehen also in bester Übereinstimmung mit den früheren Angaben von Embden, Salomon und

Bietet man also der Leber ein Übermaß von natürlichem Leucin, so wird das letztere genau so wie die unnatürliche Komponente zu einem Teile über Acetessigsäure abgebaut.

Zum Schlusse möchte ich nur noch betonen, daß in den Versuchen dieser Arbeit, und ebenso in unseren früheren Durchblutungsversuchen, die am Ende des Versuchs vorhandene Acetessigsäuremenge aller Voraussicht nach keineswegs der gesamten, während des Versuchs gebildeten entspricht. Aus den Befunden von Embden und Michaud[1]) geht vielmehr hervor, daß die Leber in hohem Maße die Fähigkeit besitzt, Acetessigsäure zum Verschwinden zu bringen.

Die am Ende des Versuches gefundenen Gesamtacetonwerte sind also nur als Minimalwerte aufzufassen.

Schmidt über die Acetonbildung aus Leucin. Nur ein Versuch der genannten Autoren (Embden, Salomon und Schmidt, l. c.), S. 135, Versuch 10) erscheint auffällig. Hier erfolgte bei Anwendung von 2 g Leucin aus Caseïn eine Acetonbildung von 93 mg pro Liter, allerdings bei einer Durchblutungsdauer von 75 Minuten. Leider stand mir nichts mehr von dem damals verwendeten Präparat zur Verfügung. Es erscheint nach der Darstellungsweise nicht völlig ausgeschlossen, daß es mehr oder weniger vollständig racemisiert war.

[1]) G. Embden und L. Michaud, Über den Abbau der Acetessigsäure im Tierkörper. Erste Mitteilung. Diese Beiträge, dieser Band, S. 332.

Kürzere Mitteilungen.

8. Eine Farbenreaktion des Histidins.

Von **Franz Knoop.**

Aus der med. Abt. des chem. Laboratoriums der Universität Freiburg i. Br.

Auf dem Physiologen-Kongreß in Heidelberg konnte ich eine Farbenreaktion des Histidins demonstrieren, die wir im Verlaufe unserer Untersuchungen über das Histidin[1]) beobachtet hatten. Ihre Anwendung scheint bei der Aufarbeitung von Eiweißspaltgemischen mehrfach gute Dienste geleistet zu haben, und ich entspreche einem Wunsche von seiten englischer und deutscher Physiologen, wenn ich das Wesentliche kurz zusammenstelle.

Versetzt man eine wässerige Lösung von Histidin oder Histidinsalz mit Bromwasser, so tritt anfangs schon in der Kälte Entfärbung ein, nach weiterem Bromzusatz bleibt ein gelblicher Ton bestehen. Erhitzt man jetzt, so wird die Lösung zunächst wieder farblos, um nach kurzem eine rötliche Färbung anzunehmen, die sich zu dunklem Weinrot vertieft. Schließlich scheiden sich schwarze amorphe Teilchen ab, die die Lösung schmutzig trüben. In der Kälte treten die gleichen Erscheinungen entsprechend langsamer ein. In Lösungen, die freies Alkali enthalten, bleiben sie aus. Die Menge des Broms wählt man am besten so, daß in der Kälte die Gelbfärbung gerade bestehen bleibt; weniger Brom läßt die Färbung schwächer ausfallen, ein großer Überschuß verhindert ihr Auftreten ganz.

Die Empfindlichkeit der Reaktion ist keine sehr große. In Lösungen von 1:100 entsteht eine sehr starke Färbung, in solchen von 1:1000 eine immerhin charakteristische. Von nahestehenden Histidinderivaten geben Imidazolpropionsäure, -essigsäure, -carbonsäure, -α-milchsäure (Oxydesaminohistidin) und die demnächst zu beschreibende β-Imidazol-α-chlorpropionsäure keine Färbung mit Brom. Nur das Imidazoläthylamin gibt eine Rotfärbung, doch ist das Verhalten hier etwas abweichend.

---

[1]) Diese Beiträge **7**, 144; **8**, 407; **10**, 111.

Freiburg i. B., Februar 1908.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie" erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge" soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen" kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

---

XI. Band 10. Heft

(Ausgegeben Juni 1908)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1908

Inhalt des 10. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

XXVIII.

Über den Mechanismus der Saponinhämolyse.

Von **Kurt Meyer.**

(Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg.)

Die ersten Untersuchungen über den Mechanismus der Saponinhämolyse wurden von Ransom[1]) unternommen. Er fand, daß normales Blutserum eine Hemmungswirkung gegenüber der Saponinhämolyse ausübt, und stellte fest, daß die hemmende Substanz sich dem Serum durch Ätherextraktion entziehen läßt. Weiter beobachtete er, daß auch durch rote Blutkörperchen das Saponin gebunden und unwirksam gemacht wird, daß die Bindung durch die Stromata, nicht durch das Hämoglobin erfolgt und daß auch hier die bindende Substanz sich durch Äther extrahieren läßt. Es lag also nahe, diese Substanz unter den Lipoiden zu suchen. In der Tat konnte Ransom nachweisen, daß Cholesterin eine gewisse Menge Saponin unwirksam zu machen vermag, während beim Lecithin eine solche Wirkung nicht festzustellen war.

Auf Grund dieser Tatsachen faßt Ransom die Saponinhämolyse so auf, daß „eine Affinität oder ein Lösungsverhältnis zwischen Saponin und Cholesterin besteht, wodurch es dem ersteren möglich ist, auf die Gewebe, welche letzteres enthalten, als Gift zu wirken, das letztere aber unter gewissen Bedingungen zum Schutzkörper gegen das erstere macht. Das Saponin ist für die roten Blutkörperchen giftig, indem es einen wesentlichen Teil ihrer Struktur — das Cholesterin — angreift“.

Gelegentlich einer früheren Arbeit wies ich[2]) darauf hin, daß die Deutung Ransoms sich auf überzeugende Beweise nicht stützt. Ransom hat nur nachgewiesen, daß eine Bindung des

---

[1]) Ransom, Deutsch. med. Wochenschr. 27, 194 (1901).
[2]) Kurt Meyer, Archiv f. Hygiene 65, 293 (1908).

Saponins an das Cholesterin möglich ist. Die weitere Annahme, daß dieser Vorgang bei der Hämolyse tatsächlich eine Rolle spielt, und vor allem, daß die Verbindung des Saponins mit dem Cholesterin eine Schädigung des Blutkörperchenstromas bedeutet, begründet er durch keine Tatsachen.

Es ist nun, wie mir scheint, durchaus nicht ohne weiteres einzusehen, warum durch die Bindung des Saponins an das Cholesterin eine Auflösung des Blutkörperchens erfolgen soll. Die Cholesterin-Saponinverbindung ist eine wasserunlösliche Substanz, die in ihren physikalischen Eigenschaften sich vom Cholesterin nicht wesentlich unterscheidet, und man darf wohl annehmen, daß gerade diese für die funktionelle Aufgabe des Cholesterins innerhalb der Blutkörperchenstruktur maßgebend sind.

Von wesentlicher Bedeutung dürfte dagegen die Löslichkeit des ja einen Hauptbestandteil des Blutkörperchenstromas bildenden Lecithins in Saponinlösungen sein. Kobert[1]) hatte bereits gezeigt, daß Saponin beim Erhitzen große Mengen Lecithins löste, und er hatte sogar durch Berechnungen nachzuweisen versucht, daß eine bestimmte Quantität Saponin gerade so viel Blutkörperchen zu lösen vermag, als deren Lecithingehalt entspricht. Obgleich er demnach der Saponinlöslichkeit des Lecithins den Hauptanteil bei der Hämolyse zuschrieb, so ließ er doch die Ransomsche Hypothese gelten und nahm nebenher eine durch die Verbindung des Cholesterins mit dem Lecithin bedingte Schädigung des Blutkörperchens an.

Auch H. Meyer[2]) vertritt noch ganz neuerdings die Anschauungen Ransoms.

Demgegenüber zeigte Pascucci[3]) bei seinen auf Hofmeisters Veranlassung unternommenen Versuchen an „künstlichen Blutkörperchen“, d. h. Lecithin-Cholesterin-Seidenstoffmembranen, daß diese der Saponinhämolyse einen um so größeren Widerstand bieten, je mehr Cholesterin im Verhältnis zum Lecithin sie enthalten. Allerdings gab sich diese Resistenz nur durch eine Verzögerung, nicht durch ein vollständiges Ausbleiben der Hämolyse zu erkennen.

Ich wies nun bereits früher darauf hin, daß sich ein Urteil über die Rolle des Cholesterins innerhalb des „lebenden“ Blutkörperchens vielleicht durch vergleichende Untersuchungen an den Erythrocyten verschiedener Tierarten, die in dem Verhältnis ihres

[1]) Kobert, Beiträge z. Kenntnis der Saponinsubstanzen. Stuttgart 1904.
[2]) H. Meyer, Wien. klin. Wochenschr. 21, 607 (1908).
[3]) Pascucci, Diese Beiträge 6, 552 (1905).

Lecithin- und Cholesteringehaltes zum Teil bedeutende Differenzen aufweisen, gewinnen ließe. Ich habe seitdem diese Versuche ausführen können und will hier kurz über sie berichten.

Ransom hatte auf eine Bindung des Saponins an das Cholesterin geschlossen, weil das Cholesterin die Saponinhämolyse hemmt, während er beim Lecithin eine solche Wirkung nicht beobachten konnte. Auch Noguchi[1]) sah nur beim Cholesterin, nicht beim Lecithin einen hemmenden Einfluß. Ich selbst habe die Versuche wiederholt und konnte abweichend von diesen Autoren eine deutliche Hemmung durch Lecithinzusatz feststellen; sie äußerte sich allerdings nicht in einem Ausbleiben der Hämolyse, sondern nur in einer bedeutenden Verzögerung, die sich noch gegenüber der zehnfachen lösenden Menge Saponin deutlich bemerkbar machte. Von einer protokollarischen Wiedergabe der Versuche sehe ich ab, weil sich der Moment der beginnenden und eben vollständigen Hämolyse nicht mit genügender Sicherheit bestimmen läßt.

Da die von mir verwendeten Mengen Lecithins, 0,2 bis 0,5 mg, schon an sich stark hämolytisch wirken, so darf die verspätet beginnende Hämolyse wohl überhaupt als Lecithinwirkung aufgefaßt werden, für die gerade ein langsamer Eintritt charakteristisch ist. Wenn Kobert bei der von ihm dargestellten Saponin-Lecithinverbindung noch eine hämolytische Wirksamkeit beobachtete, so braucht diese nicht auf das Saponin bezogen zu werden, kann vielmehr auch durch das Lecithin bedingt sein. Ich glaube demnach, daß im Hemmungsversuch sich auch eine Affinität des Saponins zum Lecithin nachweisen läßt, daß also der Ransomschen Theorie, die auf Grund jenes Versuches im Cholesterin den alleinigen Angriffspunkt des Saponins erblickt, ihre wesentlichste Stütze entzogen ist.

Mit den Tatsachen, die sich bei der vergleichenden Untersuchung verschiedener Blutarten ergaben, dürfte sich die Theorie ebenfalls nicht vereinigen lassen.

Ich verwendete mehrfach gewaschene Blutkörperchen vom Pferd, Kaninchen, Schwein, Hund, Hammel und Rind und zwar in 5 prozentiger Aufschwemmung. Das von mir benutzte Saponin war ein Mercksches Präparat. Ich arbeitete stets mit der gleichen Stammlösung. In allen Versuchen wurde durch Kochsalzlösung das gleiche Volumen hergestellt.

---

[1]) Noguchi, University of Pennsylvania Medical Bulletin. Nov. 1902.

Angaben über den Lecithin- und Cholesteringehalt der Blutkörperchen verschiedener Tierarten finden sich bei Abderhalden[1]). Ich stelle hier die Zahlen zusammen und füge die Werte für den Gesamtlipoidgehalt und das Verhältnis von Lecithin : Cholesterin hinzu. 1000 Teile Erythrocyten enthalten bei

	Pferd I	Pferd II	Kaninchen	Schwein	Hund I	Hund II	Schaf I	Schaf II	Rind	Stier
Cholesterin	0,388	0,661	0,720	0,489	2,155	1,255	2,360	3,593	3,379	1,824
Lecithin	3,973	4,855	4,627	3,456	2,568	2,296	3,379	4,163	3,748	2,850
Gesamtlipoidgehalt .	4,361	5,536	5,347	3,945	4,723	3,451	5,745	7,756	7,127	4,674
Lecithin : Cholesterin	10,240	7,345	6,426	7,067	1,192	1,829	1,428	1,159	1,109	1,563

Man ersieht aus den Zahlen zunächst, daß ziemlich erhebliche individuelle Unterschiede vorkommen. Dennoch lassen sich ohne weiteres zwei Gruppen sondern, die eine mit niedrigem Cholesteringehalt: zu ihr gehören Pferd, Kaninchen, Schwein; die andere cholesterinreich: sie umfaßt Hund, Schaf und Rind. Der Gesamtlipoidgehalt weist weniger große Unterschiede auf.

Die nachfolgende Tabelle zeigt das Ergebnis der Hämolyseversuche bei diesen Tierarten (Tab. I).

Auch in der Empfindlichkeit gegenüber dem Saponin zeigen sich innerhalb einer Blutart individuelle Unterschiede. Trotzdem ergibt sich aus den Zahlen mit Sicherheit eine mit steigendem Cholesteringehalt zunehmende Resistenz der Blutkörperchen. Stellen wir die Grenzwerte zusammen, bei denen eben noch komplette Hämolyse zu beobachten war, so finden wir sie

beim Pferd bei . . . . 0,04—0,08
„ Kaninchen bei . . . . . . 0,04—0,06
„ Schwein bei . . . . 0,06—0,08
„ Hund bei 0,08
„ Hammel bei 0,1
„ Rind bei 0,1

Berücksichtigen wir noch die Werte für die beginnende Hämolyse, so finden wir auch zwischen Hammel und Rind Empfindlichkeitsunterschiede. Mit Ausnahme des Kaninchens gehen also, wie sich aus diesen Zahlen ergibt, Resistenz und Cholesteringehalt parallel. Kaninchen, Pferd und Schwein besitzen die empfindlich-

[1]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 65.

Tabelle I.

Tierart	Saponinmenge in mg				
	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02
Pferd I	k. H.	k. H.	f. k. H.	Spur	0
Pferd II	k. H.	k. H.	f. k. H.	i. H.	0
Pferd III	k. H.	k. H.	k H.	k. H	i. H.
Pferd IV	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.	0
Kaninchen I	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	0
Kaninchen II	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.
Kaninchen III	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.
Kaninchen IV	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.	0
Schwein I	k. H.	k. H.	i. H.	Spur	0
Schwein II	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.	0
Schwein III	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.	0
Schwein IV	k. H.	k. H.	k. H.	f. k. H.	i. H.
Schwein V	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.	0
Schwein VI	k. H.	k. H.	k. H.	f. k. H.	0
Hund I	k. H.	k. H.	f. k. H.	0	0
Hund II	k. H.	k. H.	f. k. H.	i. H.	0
Hammel I	k. H.	i. H.	Spur	0	0
Hammel II	k. H.	f. k. H.	i. H.	Spur	0
Hammel III	k. H.	f. k. H.	i. H.	Spur	0
Hammel IV	k. H.	f. k. H.	Spur	0	0
Hammel V	f. k. H.	i. H.	Spur	0	0
Hammel VI	k. H.	f. k. H.	i. H.	0	0
Rind I	f. k. H.	i. H.	Spur	0	0
Rind II	k. H.	f. k. H.	Spur	0	0
Rind III	k. H.	f. k. H.	i. H.	0	0
Rind IV	k. H.	i. H.	0	0	0
Rind V	k. H.	i. H.	Spur	0	0

k. H. = komplette Hämolyse, f. k. H. = fast komplette Hämolyse, i. H. = inkomplette Hämolyse. Ablesung nach einstündigem Aufenthalt bei 37°.

sten Blutkörperchen; dementsprechend ist bei ihnen der Quotient Lecithin : Cholesterin hoch. Beim Kaninchen ist allerdings der Quotient nach Abderhalden etwas niedriger als beim Pferd und Schwein; da aber nur eine einzige Analyse vorliegt, so darf man vielleicht annehmen, daß bei anderen Individuen sein Wert größer ist. Bei Hund, Hammel und Rind, deren Blutkörperchen einen reichen Cholesteringehalt aufweisen, zeigt sich eine viel größere Resistenz, und auch innerhalb dieser Kategorie sinkt die Empfindlichkeit mit dem Quotienten Lecithin : Cholesterin.

Es ergibt sich also aus den Versuchen, daß das Blutkörperchen der Saponinhämolyse gegenüber um so resistenter ist, je mehr

Cholesterin im Verhältnis zum Lecithin es enthält, daß also auch innerhalb der Erythrocyten dem Cholesterin eine Schutzwirkung zukommt und der eigentliche Angriffspunkt des Saponins im Lecithin zu suchen ist.

Die Annahme, daß die verschiedene Resistenz der Blutkörperchen auf ihrem Cholesteringehalt beruht, habe ich noch in anderer Weise zu stützen gesucht. Wie ich früher gefunden habe, besitzt gegenüber der Seifenhämolyse das Cholesterin keine hemmende Wirkung. Es war demnach zu erwarten, daß auch das in den Blutkörperchen enthaltene Cholesterin keine Schutzwirkung ausüben würde, und daß also bei der Seifenhämolyse sich nicht die gleiche Empfindlichkeitsskala finden würde wie bei der Saponinhämolyse. Ich prüfte daher auch das Verhalten der verschiedenen Blutarten gegenüber der Einwirkung ölsauren Natrons (Tab. II).

Tabelle II.

Tierart	Ölsaures Natron in mg				
	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02
Pferd II	k. H.	f. k. H.	Spur	0	0
Pferd III	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.	0
Pferd IV	k. H.	i. H.	0	0	0
Kaninchen II	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	0
Kaninchen III	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	0
Schwein I	k. H.	k. H.	k. H.	0	0
Schwein II	k. H.	k. H.	k. H.	0	0
Schwein III	k. H.	k. H.	k. H.	0	0
Schwein IV	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	0
Schwein V	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	0
Hund II	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.
Hammel III	k. H.	k. H.	i. H.	0	0
Hammel IV	k. H.	k. H.	k. H.	f. k. H.	0
Hammel V	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	0
Hammel VI	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	0
Rind II	k. H.	k. H.	k. H.	f. k. H.	0
Rind III	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	0
Rind IV	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.	i. H.
Rind V	k. H.	k. H.	k. H.	0	0

Wenn auch die bei der Seifenhämolyse sich ergebenden Werte ziemlich unregelmäßig sind, so geht doch das klar aus ihnen hervor, daß irgend ein Parallelismus zwischen Resistenz und Cholesteringehalt nicht besteht. Ja es scheint, daß gerade die cholesterinreichen Rinderblutkörperchen am empfindlichsten sind, die cholesterinarmen dagegen, von Pferd und Schwein, am resistentesten.

Nur das Kaninchenblut zeigt auch gegenüber der Seife eine hohe Empfindlichkeit.

Durch die Seifenversuche wird auch noch ein anderer Einwand entkräftet. Die gegen Saponin empfindlichen Blutarten zeigen einen etwas niedrigeren Gesamtlipoidgehalt als die resistenten. Man könnte daher glauben, daß bei ihnen erst nach Auflösung einer größeren Menge die Sättigungsgrenze der Saponinlösung für Lipoide erreicht wird. Demgegenüber zeigt aber der Ausfall der Seifenhämolyse, die wohl ebenfalls im wesentlichen als Lösung des Lecithins aufzufassen ist, daß den geringen Unterschieden im Gesamtlipoidgehalt keine Bedeutung zukommt.

Noch eine andere, allerdings sehr gezwungene Deutung könnte den Saponinversuchen gegeben werden. Man könnte sagen, daß eine Schädigung des Blutkörperchens erst eintritt, wenn die Saponinkonzentration im Cholesterin einen gewissen Grad überschritten hat und daß dieser Wert bei den cholesterinreichen Erythrocyten erst bei größerer Saponinmenge in der Außenflüssigkeit erreicht wird als bei den cholesterinarmen. Eine experimentelle Widerlegung dieser Deutung vermag ich nicht zu geben. Vor allem wäre gegen sie einzuwenden, daß sie einen durch nichts bewiesenen schädlichen Einfluß der Bindung des Saponins an das Cholesterin voraussetzt und daß sie die augenfällige Wirkung des Saponins auf das Lecithin nicht berücksichtigt.

Wir werden uns demnach die Saponinhämolyse als eine Auflösung des Lecithins im Saponin vorzustellen haben, wobei ein Teil des Saponins an das Cholesterin, zu dem es vielleicht eine etwas größere Affinität besitzt als zum Lecithin, gebunden wird. Je höher aber der Gehalt des Blutkörperchens an Cholesterin ist, um so mehr Saponin wird von diesem gebunden und für das Lecithin unschädlich gemacht, d. h. um so größere Mengen sind zur Hämolyse erforderlich.

Von Interesse ist, daß das Verhältnis Lecithin : Cholesterin noch für andere Vorgänge von Bedeutung zu sein scheint. Zunächst sei an den Befund von Kyes[1]) erinnert, daß zwar die Blutkörperchen von Hund, Pferd und Kaninchen von Cobragift gelöst werden, nicht aber die von Rind und Hammel, also die cholesterinreichen; bei diesen tritt Hämolyse erst nach Zusatz von Lecithin ein, nachdem also der relative Cholesteringehalt des ganzen Gemisches herabgesetzt ist. Allerdings fällt bei der

---

[1]) Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 39, 886 (1902).

Schlangengifthämolyse das Hundeblut aus der Reihe; es wird viel leichter gelöst als Pferde- und Kaninchenblut, obgleich es einen bedeutend höheren Cholesteringehalt aufweist als diese Blutarten. Es muß daher zweifelhaft bleiben, inwieweit bei der Cobragifthämolyse der Quotient Lecithin : Cholesterin von Bedeutung ist.

Mit viel größerer Berechtigung darf man ihm wohl bei einer anderen Erscheinung eine Rolle zuschreiben. Hirschfeld[1]) hat gefunden, daß die Blutkörperchen verschiedener Tierarten bezüglich ihrer Agglutinabilität durch die verschiedensten Normalsera, durch Abrin usw. eine konstante Reihenfolge bilden; sie ist die gleiche wie bei der Saponinhämolyse: Pferd, Kaninchen, Schwein, Hund, Hammel, Rind. Die Übereinstimmung ist zu auffallend, als daß man nicht gleiche Ursachen vermuten sollte. Wie hier die Beziehungen zum Lecithin- und Cholesteringehalt liegen, ist schwer zu sagen. Nach den Untersuchungen von Porges und Neubauer[2]) sind Lecithinsuspensionen viel stabiler als solche von Cholesterin, und man könnte daher erwarten, daß mit steigendem Cholesteringehalt auch die Agglutinabilität zunimmt. Aber gerade das Gegenteil ist der Fall. Überraschen kann das nicht; denn wir wissen, besonders auch aus den Untersuchungen von Hirschfeld, daß die Hämagglutination von ganz anderen Gesetzen beherrscht wird als die Ausflockung der Suspensionskolloide. Es bedarf aber weiterer Untersuchungen, um festzustellen, welcher Zusammenhang zwischen Agglutinabilität und chemischer Zusammensetzung des Blutkörperchens besteht.

---

[1]) Hirschfeld, Archiv f. Hygiene 63, 237 (1907).
[2]) Porges u. Neubauer, Biochem. Zeitschr. 7, 152 (1907).

XXIX.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

Siebente Mitteilung.

Über die Bildung von Acetessigsäure aus Isovaleriansäure bei der Leberdurchblutung.

Von **E. Friedmann.**

(Aus der ersten medizinischen Universitätsklinik zu Berlin.)

Gelegentlich von Untersuchungen über das Verhalten der verzweigten methylierten α-Aminosäuren im Tierkörper[1]) habe ich beobachtet, daß die verzweigten methylierten Aminosäuren mit tertiärem Wasserstoff in β-Stellung zur Karboxylgruppe in hervorragender Weise vom Tierkörper ausgenutzt werden können. Ich glaubte diese Tatsachen vorläufig im Sinne einer Oxydation der das tertiäre Wasserstoffatom tragenden Gruppe deuten zu können, einer Oxydation, für die die β-Stellung des tertiären Wasserstoffs zur Karboxylgruppe die begünstigte Anordnung bietet.

Um den chemischen Vorgängen des Abbaues der verzweigten Säuren näher zu kommen, habe ich versucht, die von Embden[2]) beobachtete Bildung von Acetessigsäure aus Isovaleriansäure,

$$\underset{\text{Isovaleriansäure}}{\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>CH.CH_2.COOH} \longrightarrow \underset{\text{Acetessigsäure}}{CH_3.CO.CH_2.COOH}$$

näher zu verfolgen, und prüfte, unabhängig von den erwähnten theoretischen Vorstellungen, solche Derivate der Isovaleriansäure auf ihr Vermögen, bei der Leberdurchblutung Acetessigsäure zu bilden, die sich von der Isovaleriansäure durch Ersatz von Wasserstoff durch Hydroxyl oder von Methyl durch Karboxyl ableiteten.

---

[1]) Diese Beiträge **11**, 177.
[2]) Ebenda **8**, 129.

Ich begann diese Durchblutungsversuche mit der Prüfung, ob α-Oxyisovaleriansäure in der überlebenden Hundeleber zu Acetessigsäure abgebaut werden kann.

Tabelle I.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durchblutungszeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
1	2 g α-Oxyisovaleriansäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 „ Rinderblut	275	72	34,1
2	2 g α-Oxyisovaleriansäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 „ Rinderblut	290	110	23,2

Die Versuche zeigen, daß α-Oxyisovaleriansäure nicht in Aceton und daher auch nicht in Acetessigsäure übergehen kann.

Anders war das Verhalten der β-Oxyisovaleriansäure.

Tabelle II.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durchblutungszeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Gesamtacetons mg	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons aus neugebildeter Acetessigsäure mg
3	1,5 g β-Oxyisovaleriansäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	354	75	43,3	—
4	1,5 g β-Oxyisovaleriansäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	342	86	54,4	48,6

Die Tabelle II zeigt, das β-Oxyisovaleriansäure ein Bildner von Acetessigsäure und Aceton ist.

Darauf ging ich dazu über, das Verhalten einer in γ-Stellung zur Karboxylgruppe durch Oxydation veränderten Isovaleriansäure bei der Leberdurchblutung zu prüfen und wählte hierzu die Brenzweinsäure.

Tabelle III.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durch-blutungs-zeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
5	2 g Brenzweinsäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 „ Rinderblut	175	75	24,9
6	2 g Brenzweinsäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 „ Rinderblut	283	75	16,8

Die Brenzweinsäure geht, wie die Zahlen der Tabelle III ergeben, nicht in Aceton über, eine Tatsache, die in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Baer und Blum[1]) steht, die beim schweren Diabetes nach Eingabe von Brenzweinsäure keine Vermehrung der β-Oxybuttersäureausscheidung erzielen konnten.

Ebensowenig wie die Brenzweinsäure kann die Citramalsäure als Zwischenprodukt bei der Bildung von Acetessigsäure aus Isovaleriansäure in Betracht kommen.

Tabelle IV.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durch-blutungs-zeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
7	2 g Citramalsäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 „ Rinderblut	288,5	168	20
8	1 g Citramalsäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 „ Rinderblut	202,7	89	29,8

Die Tabelle V gibt die Zusammenstellung der gewonnenen Resultate.

Von den untersuchten Substanzen kann allein die β-Oxyisovaleriansäure als Zwischenprodukt beim Übergang von Isovaleriansäure in Acetessigsäure in Betracht kommen.

Unabhängig von dieser Möglichkeit weisen die mitgeteilten Versuche darauf hin, daß der Abbau der Isopropylgruppe der

[1]) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 56, 92.

Tabelle V.

Substanz	Übergang in $CH_3.CO.CH_2.COOH$
Isovaleriansäure, $\frac{CH_3}{CH_3}>CH.CH_2.COOH$	+ (Embden)
α-Oxyisovaleriansäure, $\frac{CH_3}{CH_3}>CH.CH(OH).COOH$ . .	—
β-Oxyisovaleriansäure, $\frac{CH_3}{CH_3}>C(OH).CH_2.COOH$ . .	+
Brenzweinsäure, $\frac{CH_3}{COOH}>CH.CH_2.COOH$	—
Citramalsäure, $\frac{CH_3}{COOH}>C(OH).CH_2.COOH$	—

Isovaleriansäure im Tierkörper nicht auf dem Wege der Oxydation einer Methylgruppe zur Karboxylgruppe und nachträglicher Elimination der entstandenen Karboxylgruppe verläuft, da weder Brenzweinsäure noch Citramalsäure in Acetessigsäure übergehen. Da neuere Versuche [1]) gezeigt haben, daß auch die chemische Oxydation der Methylgruppen nicht notwendigerweise zur Karboxylgruppe führt, so sollen die Versuche nach dieser Richtung fortgeführt werden.

Chemischer Teil.

1. α-Oxyisovaleriansäure wurde nach den Angaben von Schmidt und Sachtleben [2]) dargestellt. Zur Charakterisierung führte ich sie in das von Lipp [3]) beschriebene Zinksalz über, das bei 110° getrocknet und analysiert wurde.

0,2917 g Substanz gaben 0,0792 g ZnO.

	Berechnet für $C_{10}H_{18}O_6Zn$	Gefunden
Zn	21,83 Proz.	21,82 Proz.

Zur Durchblutung wurde diese Substanz wie die folgenden in der berechneten Menge $\frac{n}{1}$ Natronlauge gelöst, mit 0,8 g Kochsalz versetzt und die Lösung auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt.

2. Zur Darstellung der β-Oxyisovaleriansäure habe ich folgenden Weg eingeschlagen.

62,5 g Jodessigester werden mit 21,2 ccm Aceton vermischt und auf 19 g geraspeltes Zink langsam unter guter Kühlung eingetröpfelt. Nachdem die Hälfte des Reaktionsgemisches in sechs

[1]) Berl. Ber. 32, 432; 34, 2423; 41, 297.
[2]) Ann. d. Chem. 193, 106.
[3]) Ebenda 205, 28.

Stunden eingetragen ist, läßt die Reaktion an Heftigkeit nach, und die zweite Hälfte kann bei Zimmertemperatur innerhalb drei Stunden eingetragen werden. Nach 24 stündigem Stehen wird das Ganze zum Schluß noch drei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Die dickliche braune Flüssigkeit wird in Eis eingekühlt und mit eisgekühlter Schwefelsäure zersetzt. Es bleiben 5 g Zink unangegriffen. Die wässerige Flüssigkeit wird mit Äther wiederholt ausgezogen, mit Bisulfit und darauf zweimal mit je 50 ccm 5 proz. Sodalösung durchgeschüttelt. Nachdem die ätherische Lösung über geglühtem Natriumsulfat getrocknet ist, wird der nach Abdestillieren des Äthers erhaltene sirupöse Rückstand unter vermindertem Druck fraktioniert. Bei 13 mm und 68 bis 69° gehen 22,5 g einer wasserklaren Flüssigkeit über. Diese ist ein Gemisch von unverändertem Jodessigester und β-Oxyisovaleriansäureester, deren Trennung mir nicht gelang. Zur Gewinnung der β-Oxyisovaleriansäure aus diesem Gemisch werden 20 g Ester mit 12 g Kaliumhydroxyd und 50 ccm Wasser emulgiert und in der Wärme verseift. Die Verseifung ist in wenigen Minuten beendigt. Nach dreistündigem Erwärmen im offenen Gefäße wird die Flüssigkeit mit Schwefelsäure angesäuert, wiederholt mit Äther ausgeschüttelt, der Äther über Natriumsulfat getrocknet und abdestilliert. Der zurückbleibende Sirup wird in 1 Liter Wasser gelöst und die Lösung in der Wärme mit Silberoxyd gesättigt. Beim Eindampfen werden 11,9 g Silbersalz der β-Oxyisovaleriansäure erhalten. Zur Analyse wurde das Silbersalz aus Wasser umkristallisiert und bei 100° getrocknet.

0,1444 g Substanz gaben 0,0691 g Ag,
0,1634 „ „ „ 0,1627 g CO_2 und 0,0595 g H_2O.

	Berechnet für $C_5H_9O_3Ag$	Gefunden
C	26,67 Proz.	27,16 Proz.
H	4,03 „	4,07 „
Ag	47,97 „	47,87 „

Zur Durchblutung wurde das analysierte Silbersalz in 50 ccm Wasser, das die berechnete Menge Kochsalz enthielt, in der Wärme eingetragen, vom Chlorsilber abfiltriert, das Filtrat mit 0,8 g Kochsalz versetzt und auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt.

3. Brenzweinsäure wurde nach den Angaben von Béchamp[1]) dargestellt. Zur Charakterisierung stellte ich das Kaliumsalz dar, das bei 110° getrocknet und analysiert wurde.

[1]) Zeitschr. f. Chem. 1870, S. 371.

0,2080 g Substanz gaben 0,1721 g K_2SO_4.

	Berechnet für $C_5H_6O_4K_2$	Gefunden
K	37,59 Proz.	37,17 Proz.

4. Citramalsäure wurde nach der von Michael[1] gegebenen Vorschrift bereitet. Bei der Analyse des bei 110° getrockneten Kaliumsalzes wurden folgende Zahlen erhalten.

0,2099 g Substanz gaben 0,1601 g K_2SO_4.

	Berechnet für $C_5H_6O_5K_2$	Gefunden
K	34,91 Proz.	34,25 Proz.

[1]) Journ. f. prakt. Chem. [2] **46**, 287.

XXX.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

Achte Mitteilung.

Über das Verhalten der α, β-ungesättigten Säuren bei der Leberdurchblutung.

Von **E. Friedmann.**

(Aus der ersten medizinischen Universitätsklinik zu Berlin.)

Über das Verhalten der ungesättigten Säuren im Tierkörper liegen nur spärliche einschlägige Untersuchungen vor. Von den aliphatischen ungesättigten Säuren ist bekannt, daß Akrylsäure, nach Versuchen von Luzzatto[1]) an Hunde als Natronsalz verfüttert, anscheinend zerstört wird, ohne daß eine Ausscheidung von Derivaten derselben beobachtet werden konnte, wogegen die Crotonsäure nur bezüglich ihrer physiologischen Wirkung geprüft zu sein scheint[2]). Von den aromatischen, ungesättigten Säuren ist durch Graebe und Schultzen[3]) ermittelt worden, daß Zimtsäure als Hippursäure zur Ausscheidung gelangt, und für die Phenylisocrotonsäure hat Knoop[4]) gezeigt, daß diese Säure in Phenacetursäure umgewandelt wird.

Bei Versuchen, die ich anstellte, um den chemischen Vorgang der Bildung von Acetessigsäure aus Isovaleriansäure kennen zu lernen[5]), hatte ich auch Veranlassung genommen, Dimethylakrylsäure auf ihr Vermögen, in der überlebenden Hundeleber Acetessigsäure zu bilden, zu prüfen, und habe dabei beobachtet, daß Dimethylakrylsäure ein ausgezeichneter Bildner von Acet-

---

[1]) Diese Beiträge 7, 456.
[2]) Albertoni, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 18, 218.
[3]) Ann. d. Chem. 142, 345.
[4]) Diese Beiträge 6, 150.
[5]) Diese Beiträge, siebente Mitteilung.

essigsäure ist. Die nachstehende Tabelle gibt die erhaltenen Zahlen wieder.

Tabelle I.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durch-blutungszeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Gesamtacetons mg	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons aus neugebildeter Acetessigsäure mg
1	1,5 g Dimethylakrylsäure 100 ccm physiol. Na Cl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	343,8	78	67,8	48,3
2	1,5 g Dimethylakrylsäure 100 ccm physiol. Na Cl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	291	74	74,8	62,1

Es bestand nun die Möglichkeit, dieses Resultat in der Weise zu deuten, daß der Tierkörper über Bedingungen verfügt, die eine Methylgruppe des Isopropylrestes in der Isovaleriansäure als Karboxylgruppe von der Dimethylakrylsäure aus zu eliminieren, und es war daher zu untersuchen, ob die beiden isomeren Säuren, die Citrakonsäure und die Mesakonsäure, bei der Durchströmung der überlebenden Leber in Acetessigsäure übergehen.

Tabelle II.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durch-blutungs-zeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
3	2 g Citrakonsäure 100 ccm physiol. Na Cl-Lösung 1500 „ Rinderblut	329	75	28,5
4	2 g Citrakonsäure 100 ccm physiol. Na Cl-Lösung 1500 „ Rinderblut	312	81	24,7
5	2 g Mesakonsäure 100 ccm physiol. Na Cl-Lösung 1500 „ Rinderblut	296	78	31
6	2 g Mesakonsäure 100 ccm physiol. Na Cl-Lösung 1500 „ Rinderblut	285	76	27,97

Die Tabelle II zeigt, daß weder Citrakonsäure noch Mesakonsäure in Acetessigsäure übergehen.

Es bestand aber noch eine andere Möglichkeit, die Bildung von Acetessigsäure aus Dimethylakrylsäure zu erklären. Dimethylakrylsäure konnte durch Wasseranlagerung in β-Oxyisovaleriansäure übergehen, deren Abbau zu Acetessigsäure ich nachgewiesen hatte [1]. Sollte diese Deutung zutreffen, so war in analoger Weise zu erwarten, daß Crotonsäure in Acetessigsäure übergeführt werden kann.

Tabelle III.

Nummer des Versuches	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durchblutungszeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Gesamtacetons mg	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons aus neugebildeter Acetessigsäure mg
7	2 g Crotonsäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	273	108	50,8	39,5
8	2 g Crotonsäure 100 ccm physiol. NaCl-Lösung 1500 ccm Rinderblut	255	74	107,9	75,2

Die Tabelle III zeigt, daß Crotonsäure ein ausgezeichneter Bildner von Acetessigsäure ist.

Die gewonnenen Resultate sind in der Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Substanz	Übergang in $CH_3.CO.CH_2.COOH$
Dimethylakrylsäure, $\frac{CH_3}{CH_3}>C=CH.COOH$	+
Citrakonsäure, $\frac{CH_3}{COOH}>C=CH.COOH$	—
Mesakonsäure, $\frac{CH_3}{HOOC}>C=CH.COOH$	—
Crotonsäure, $CH_3.CH=CH.COOH$	+

[1]) Diese Beiträge, l. c.

Die Bildung von Acetessigsäure aus Crotonsäure ist wohl kaum anders als durch intermediäre Bildung von β-Oxybuttersäure zu erklären:

$$CH_3.CH{=}CH.COOH \longrightarrow CH_3.CH(OH).CH_2.COOH$$
$$\longrightarrow CH_3.CO.CH_2.COOH.$$

Analog ist für die Entstehung der Acetessigsäure aus Dimethylakrylsäure das Auftreten von β-Oxyisovaleriansäure als Zwischenprodukt anzunehmen:

$$\frac{CH_3}{CH_3}{>}C{=}CH.COOH \longrightarrow \frac{CH_3}{CH_3}{>}C(OH).CH_2.COOH$$
$$\longrightarrow CH_3.CO.CH_2.COOH.$$

Der Abbau der untersuchten α, β-ungesättigten Säuren im Tierkörper zur Acetessigsäure scheint also in der Art zu erfolgen, daß diese Säuren unter Wasseranlagerung in die entsprechenden gesättigten β-Oxysäuren übergehen und als solche abgebaut werden.

Die Versuche bringen ferner eine Bestätigung für die bereits früher[1]) ermittelte Tatsache, daß der Abbau der Methylgruppe des Isopropylrestes in der Isovaleriansäure nicht über die Karboxylgruppe verlaufen kann, da weder Citrakonsäure noch Mesakonsäure, wohl aber Dimethylakrylsäure und Crotonsäure in Acetessigsäure übergehen.

Chemischer Teil.

Darstellung der β-Dimethylakrylsäure. Diese Säure wurde zum Teil nach der von Perkin[2]) gegebenen Vorschrift dargestellt. Auch die Kondensation von Aceton und Jodessigester bei Gegenwart von geraspeltem Zink liefert Dimethylakrylsäure in befriedigender Ausbeute.

65 g Jodessigester, 22 ccm Aceton und 20 g Zinkspäne wurden in der bei der Darstellung der β-Oxyisovaleriansäure[3]) geschilderten Weise zur Reaktion gebracht. Bei der Destillation des Rohproduktes unter vermindertem Druck wurden 26,3 g Ester erhalten, die ein Gemenge von unverändertem Jodessigester und β-Oxyisovaleriansäureester waren. Die Wasserabspaltung wurde nach der Methode von Wallach[4]) durch zweistündiges Erhitzen auf 140

---

[1]) Diese Beiträge, siebente Mitteilung.
[2]) Journ. of the Chem. Soc. 69, 1471.
[3]) Vgl. die siebente Mitteilung.
[4]) Ann. d. Chem. 357, 51.

bis 145° mit der doppelten Menge Kaliumbisulfat erzielt. Das hierbei erhaltene Reaktionsprodukt lieferte bei der Destillation bei 19 mm Druck und 67 bis 75° 12,5 g eines wasserklaren Öles, das bei der Verseifung mit 6 g Kaliumhydroxyd und 15 ccm Wasser 7,5 g Dimethylakrylsäure ergab. Zur Analyse wurde die Substanz (F. 69 bis 70°) im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1127 g Substanz gaben 0,2489 g CO_2 und 0,0841 g H_2O.

	Berechnet für $C_5H_8O_2$	Gefunden
C	60,00 Proz.	60,23 Proz.
H	8,00 „	8,35 „

XXXI.

Eine neue Synthese des Isoleucins.

Von **W. Brasch** und **E. Friedmann**.

(Aus der ersten medizinischen Universitätsklinik zu Berlin.)

Für die synthetische Darstellung des Isoleucins sind zwei Wege beschrieben worden. Der eine stammt von dem Entdecker des Isoleucins, F. Ehrlich[1]), und nimmt seinen Ausgangspunkt vom d-Valeraldehyd, dessen durch Anlagern von Blausäure und Ammoniak dargestelltes Amidonitril beim Verseifen ein Gemenge von ungefähr gleichen Teilen d-Isoleucin und Alloisoleucin lieferte. Die andere Synthese ist von Bouveault und Locquin[2]) ausgeführt worden. Diese Forscher ließen sek.-Butyljodid auf Natriumacetessigester einwirken und spalteten den erhaltenen sek. Butylacetessigester mittels Nitrosylsulfat in schwefelsaurer Lösung in Essigsäure und Oximino-sek.-butylessigsäureäthylester, $C_2H_5.CH(CH_3).C(:NOH).COOC_2H_5$. Durch Reduktion dieser Verbindung mittels Zink und alkoholischer Salzsäure wurde der α-Amino-sek.-butylessigsäureäthylester erhalten, der durch Schütteln mit verdünnter Natronlauge zur α-Aminomethyläthylpropionsäure, dem synthetischen Isoleucin, aufgespalten werden konnte.

Die Trennung dieser Substanz in die optisch-aktiven Komponenten führte Locquin[3]) mit Hilfe der Brucinsalze des Formylderivates aus und identifizierte die d-α-Amino-β-methyläthylpropionsäure mit dem natürlichen d-Isoleucin.

---

[1]) Berl. Ber. 37, 1809; 40, 2538.
[2]) Chem. Zentralbl. 1905, II, S. 615; 1906, II, S. 1829.
[3]) Ebenda 1907, II, S. 895, 896.

Gelegentlich von Untersuchungen über das Verhalten der verzweigten methylierten α-Aminosäuren im Tierkörper hat der eine[1]) von uns die Synthese der racemischen α-Methylamino-β-methyläthylpropionsäure ausgeführt, und es lag daher nahe, die analoge Methode zur Darstellung der entsprechenden Aminosäure, des racemischen Isoleucins, in Anwendung zu bringen.

Als Ausgangsmaterial diente die von Romburgh[2]) beschriebene sek.-Butylmalonsäure (Formel I). Durch Einwirkung von Brom wurde aus dieser die α-Brom-sek.-butylmalonsäure dargestellt (Formel II), die durch Kohlensäureabspaltung in die α-Brom-β-methyläthylpropionsäure (Formel III) übergeführt wurde. Diese lieferte beim Stehen mit konzentriertem Ammoniak die gesuchte α-Amino-β-methyläthylpropionsäure (Formel IV) in einer Ausbeute von etwa 60 Proz. der Theorie.

I.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>CH.CH\!<\!\begin{matrix} COOH \\ COOH \end{matrix}$$

sek.-Butylmalonsäure

II.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>CH.CBr\!<\!\begin{matrix} COOH \\ COOH \end{matrix}$$

α-Brom-sek.-butylmalonsäure

III.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>CH.CH(Br)COOH$$

α-Brom-β-methyläthyl-propionsäure

IV.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>CH.CH(NH_2).COOH$$

α-Amino-β-methyläthylpropionsäure (Isoleucin).

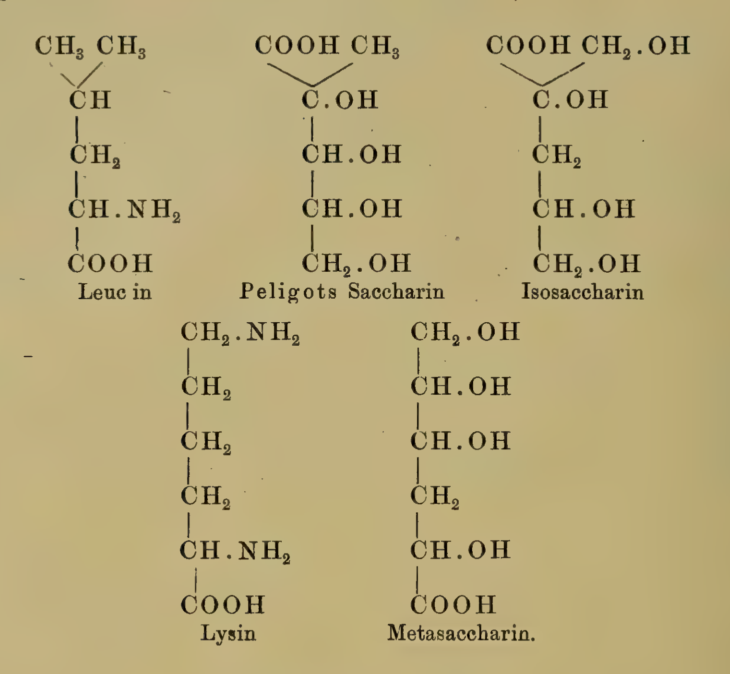
Vielleicht dürfte es von Interesse sein, auf die Analogie hinzuweisen, die in dem Bau des Kohlenstoffskeletts des Isoleucins und der Anordnung der Kohlenstoffatome in einem Derivate der Zucker, dem Parasaccharin, besteht:

```
COOH      CH3            CH2.OH  CH2.OH
|         |              |       |
CH.NH2    CH2            CH2     CH.OH
    \    /                  \   /
     CH                     C.OH
     |                      |
     CH3                    COOH
  Isoleucin             Parasaccharin.
```

In derselben Weise besteht eine Analogie im Bau des Kohlenstoffskeletts des natürlich vorkommenden Leucins und des Peligotschen Saccharins und des Isosaccharins, ferner zwischen dem Lysin und dem Metasaccharin.

---

[1]) E. Friedmann, Diese Beiträge 11, 177.
[2]) Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas 6, 153.



Experimenteller Teil.

α-Brom-sek.-butylmalonsäure.

Diese Säure war von dem einen[1]) von uns nur als dicker Sirup erhalten worden. Es gelingt leicht, sie in schönen Kristallen zu erhalten, wenn man die sirupöse Säure mehrere Tage im Vakuum über Schwefelsäure stehen läßt. Dabei erstarrt der Sirup zu einer Kristallmasse, die nach Abpressen auf Ton und einmaligem Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther bereits den richtigen Schmelzpunkt von 116,5° zeigt. Die Substanz kristallisiert in Drusen von derben Nadeln. Sie ist leicht löslich in Alkohol, Äther und Essigäther, schwer löslich in kaltem Chloroform und Benzol, löst sich aber in diesen Lösungsmitteln leicht in der Wärme und ist in Petroläther auch in der Wärme unlöslich. Zur Analyse wurde sie im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,0983 g Substanz gaben 0,1266 g CO_2 und 0,0443 g H_2O.

	Berechnet für $C_7H_{11}O_4Br$	Gefunden
C	35,15 Proz.	35,16 Proz.
H	4,64 „	5,04 „

[1]) E. Friedmann, l. c., S. 189.

α-Brom-β-methyläthylpropionsäure.

Der früher gegebenen Darstellung dieser Verbindung[1]) haben wir nichts hinzuzufügen. Zur Reinigung fraktionierten wir die Substanz unter vermindertem Druck. Das Produkt geht bei 18 mm zwischen 120 bis 136° als ganz schwach gelb gefärbtes Öl über. 53,4 g α-Brom-sek.-butylmalonsäure lieferten 42,4 g unter vermindertem Druck destillierter α-Brom-β-methyläthylpropionsäure.

α-Amino-β-methyläthylpropionsäure (Isoleucin).

42,4 g reiner α-Brom-β-methyläthylpropionsäure wurden unter Kühlung in 210 ccm 25 proz. wässerigem Ammoniak eingetragen und bei 37° fünf Tage sich selbst überlassen. Darauf wurde das unverbrauchte Ammoniak durch Kochen mit kaltgesättigtem Barytwasser vertrieben und die Flüssigkeit vom Baryum genau mit Schwefelsäure, vom Bromwasserstoff mit Silberoxyd und vom gelösten Silber durch Schwefelwasserstoff befreit. Beim Eindampfen wurden 19,7 g Rohprodukt erhalten, das aus Wasser umkristallisiert wurde. Die Ausbeute an analysenreiner Substanz betrug 16,5 g, einer Ausbeute von 58 Proz. der Theorie entsprechend.

Bei einer zweiten Darstellung wurden nach dreiwöchentlichem Stehen der Reaktionsflüssigkeit aus 22,2 g α-Brom-β-methyläthylpropionsäure 15 g Rohprodukt (berechnet 14,9 g) und 9 g reine α-Amino-β-methyläthylpropionsäure erhalten, was einer Ausbeute von 60 Proz. entspricht.

Die Substanz sublimiert beim Erhitzen in großen wolligen Flocken.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,1325 g Substanz gaben 0,2664 g CO_2 und 0,1194 g H_2O
0,2112 g „ „ 19,49 ccm N (17,7°, 764,3 mm).

	Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$	Gefunden
C	54,90 Proz.	54,83 Proz.
H	9,99 „	10,08 „
N	10,71 „	10,75 „

Das Kupfersalz der Substanz zeigte die von F. Ehrlich angegebenen charakteristischen Löslichkeitsverhältnisse und Eigentümlichkeiten der Färbung[2]). Es wurde zur Analyse bei 110° getrocknet.

---

[1]) l. c.
[2]) Berl. Ber. 37, 1826.

0,1602 g Substanz gaben 0,0392 g CuO.

	Berechnet für $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$	Gefunden
Cu	19,64 Proz.	19,55 Proz.

Anmerkung bei der Korrektur.

In dem am 9. Mai 1908 erschienenen Heft der Berl. Ber. (41, 1453) ist eine Arbeit von Felix Ehrlich veröffentlicht, in der über eine neue Synthese des Isoleucins auf dem auch von uns eingeschlagenen Wege berichtet wird. Die Mitteilung von Felix Ehrlich ist bei der Redaktion der Berichte am 27. April 1908, unsere Arbeit am 4. April 1908 bei der Redaktion dieser Beiträge eingegangen.

XXXII.

Quantitative Untersuchungen über den Reststickstoff des Blutes.

Von Dr. **Hermann Hohlweg** (Gießen) und Dr. **Hans Meyer** (Basel).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

I.

Das Problem des nicht koagulablen Anteiles der stickstoffhaltigen Blutbestandteile, des sogenannten Reststickstoffs, ist wiederholt Gegenstand der Forschung gewesen, da man von ihm Aufklärung über sehr verschiedene Fragen des Eiweißstoffwechsels, speziell über die Vorgänge der Eiweißresorption zu gewinnen hoffte. In den meisten Fällen handelte es sich bei diesen Untersuchungen um das Vorkommen ganz bestimmter Eiweißabbauprodukte im Blutserum, wie der Albumosen, der Aminosäuren oder auch des Harnstoffes.

Die großen Schwierigkeiten, welche die Methodik dieser Untersuchungen bereitet, haben ihren Grund einmal in der Schwierigkeit der quantitativen Trennung der koagulierbaren von den nicht koagulierbaren stickstoffhaltigen Bestandteilen, andererseits darin, daß die letzteren, da sie die Blutbahn nur auf dem Wege von Organ zu Organ durcheilen, im Blute stets nur in verschwindender Menge vorhanden sind. Hieraus sind auch zum Teil die stark auseinandergehenden Resultate der einzelnen Untersucher zu erklären, zumal sich diese recht verschiedener und ungleichwertiger Methoden bedienten. So bemüht man sich, um nur ein Beispiel anzuführen, seit Dezennien, die Form festzustellen, in der die im Darm resorbierten Eiweißstoffe dem Orte des Verbrauches zugeführt werden. Man hat dabei an Aminosäuren, Peptone, Albumosen und synthetisch gebildete koagulable Eiweißkörper gedacht, und die Meinungen gehen zur Zeit weiter auseinander denn je. Während z. B. in

bezug auf das Vorkommen von Albumosen im Blute Abderhalden[1]) und seine Mitarbeiter in Übereinstimmung mit älteren Befunden Neumeisters[2]) zu negativen Resultaten kommen, glauben Embden und Knoop[3]), Langstein[4]), Kraus[5]), Töpfer[6]), Freund[7]) im Anschluß an ältere Beobachtungen von Schmidt-Mülheim[8]) und Hofmeister[9]) Albumosen bzw. Biuretreaktion gebende Stoffe im Blute nachweisen zu können.

Solche und ähnliche Meinungsverschiedenheiten lassen es als nächste Aufgabe erscheinen, erst einmal die Natur der beim Reststickstoff des Blutes in Betracht kommenden Substanzen qualitativ und quantitativ genauer kennen zu lernen.

Bei der geringen Menge dieser Substanzen war man zunächst gezwungen, von einer Isolierung abzusehen und sich mit einer vorläufigen Orientierung zu begnügen, wobei die Frage, ob es sich um nähere oder entferntere Eiweißabkömmlinge handelt, naturgemäß eine große Rolle spielt.

So haben v. Bergmann und Langstein[10]) den Reststickstoff verdauender und hungernder Hunde bestimmt. Sie fraktionierten ihn in der Weise, daß sie den alkoholfällbaren Anteil bestimmten, diesen nach dem Zunzschen Verfahren — Zinksulfatfällung — in Protoalbumosen und Deuteroalbumosen trennten und weiter in dem nicht alkoholfällbaren Anteil noch den Stickstoff des Phosphorwolframsäureniederschlages ermittelten. Sie vermochten aus ihren Zahlen bindende Schlüsse nicht zu ziehen, zumal sie die Zusammensetzung des Serums nicht bei demselben Tier im Hungerzustand und während der Verdauung bestimmten, was natürlich bei den geringen Differenzen, um die es sich nur handelt, einen direkten Vergleich sehr erschwert, fassen jedoch ihre Resultate dahin zusammen, daß beim gefütterten Tier reichlich Albumosen (25 Proz. des Reststickstoffs) und viel Phosphorwolframsäure fällbare Substanzen (55 Proz.), beim Hungertier — wenn überhaupt — nur geringe Mengen von Albumosen (Maximum 9 Proz.) und nur

[1]) Abderhalden und Oppenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chemie 42, 155; Abderhalden, Funk und London, ebenda 51, 269.
[2]) Zeitschr. f. Biologie 27, 309.
[3]) Diese Beiträge 3, 120.
[4]) Ebenda 3, 373.
[5]) Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie 3, 52.
[6]) Ebenda 3, 45.
[7]) Ebenda 4, 1.
[8]) Archiv f. (Anatom.) u. Physiol. 1880, S. 33.
[9]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 51.
[10]) Diese Beiträge 6, 27.

45 Proz. durch Phosphorwolframsäure fällbare Stoffe im Plasma vorkommen. Sie betrachten auf Grund ihrer allerdings nicht sehr zahlreichen Versuche die Albumosen als einen fast konstanten Bestandteil des Blutes.

Hingegen kommen Morawitz und Dietschy[1]) für das Blutplasma zu dem entgegengesetzten Ergebnis. Sie benutzten ein von Hofmeister[2]) empfohlenes und auf den Harn mit Erfolg angewandtes Verfahren — Koagulation mit primärem Kaliumphosphat, Behandlung mit Alkohol und Zinksulfat. In allen sieben Versuchen war die Biuretreaktion im Oxalatplasma negativ, nur in einem Fall, wo das Plasma ziemlich stark hämolytisch war, fand sich schwache Reaktion. Hingegen war die Biuretreaktion in allen Fällen, wo Gesamtblut verarbeitet wurde, deutlich positiv. Morawitz und Dietschy schließen daraus, daß die nicht koagulierten eiweißähnlichen Substanzen nicht dem Plasma, sondern den Blutkörperchen entstammten. Sie sind geneigt, die Reaktion auf nicht koaguliertes Globin bzw. Hämoglobin zu beziehen, zumal da die qualitativen Reaktionen des biuretgebenden Körpers nicht unbedingt für seine Albumosennatur sprechen. Morawitz und Dietschy schließen auf Grund ihrer Versuche die Anwesenheit von Albumosen im zirkulierenden Blutplasma nicht schlechtweg aus, halten aber dafür, daß es sich jedenfalls nur um sehr kleine Werte handeln könne.

Eine Reihe von beachtenswerten einschlägigen Versuchen, die speziell die Eiweißresorption zum Gegenstand haben, stammen aus dem Laboratorium von E. Freund in Wien. G. Töpfer[3]) leitete bei Hunden das Aortenblut in die Pfortader und bestimmte darin vor und nach längerer Durchblutung 1. den Gesamtstickstoff, 2. den Eiweißstickstoff — die Differenz ergibt den Reststickstoff —, 3. den Stickstoff des durch Zinksulfatsättigung erhaltenen Niederschlages (Albumosenstickstoff), 4. den Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Körper (Pepton + Basen), 5. den Stickstoff des Phosphorwolframsäurefiltrates (Aminosäuren + Harnstoff und andere). Im nachstehenden seien die wichtigsten von ihm für normales Hundeblut ermittelten Ausgangswerte — die Veränderungen während der Durchblutung kommen zunächst nicht in Betracht — tabellarisch angeführt:

---

[1]) Morawitz und Dietschy, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 54, 1905.
[2]) Angeführt bei Morawitz und Dietschy.
[3]) Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. 3, 45.

Versuch Nr.	Gesamt-N Proz.	Rest-N Proz.	N des $ZnSO_4$-Niederschlages Proz.	N des Phosphorwolframsäureniederschlages Proz.	N des Phosphorwolframsäurefiltrates Proz.
I	3,6225	0,079	0,0049	0,0445	0,034
II	3,814	0,108	0,027	0,075	0,0311
VI	3,006	0,111	0,0817	0,086	0,028
VII . . .	3,348	0,0488	0,0046	0,00605	0,0427
VIII . . .	3,78	0,1358	0,056	0,077	0,0588

E. Freund und Töpfer[1]) teilen für das Pfortaderblut eines seit $2^1/_2$ Tagen hungernden und eines gut genährten und in Verdauung befindlichen Hundes nachstehende Zahlen mit:

	Gesamt-N Proz.	Rest-N Proz.	N des $ZnSO_4$-Niederschlages Proz.	N des Phosphorwolframsäureniederschlages Proz.	Harnstoff-N*) Proz.
Hungerhund . . .	4,47	0,048	0,015	0,019	0,026
Verdauender Hund	4,06	0,09	0,035	0,0452	0,041

*) Bestimmt nach Schöndorff.

Nach dem gleichen Verfahren bestimmte F. Kraus[2]) (Karlsbad) die Stickstoffverteilung im Femoral- und Portalblut einiger verdauender und zweier hungernder Hunde. Hier seien nur die Werte für das Blut der Femoralis angeführt:

	Gesamt-N Proz.	Rest-N Proz.	N des $ZnSO_4$-Niederschlages Proz.	N des Phosphorwolframsäureniederschlages Proz.
Verdauender Hund (I) .	3,672	0,080	0,009	0,030
„ „ (II) .	3,190	0,044	0,013	0,015
„ „ (V) .	2,730	0,049	0,046	0,047
„ „ (VI) .	2,730	0,039	0,010	0,021
Hungerhund (III) . . .	3,325	0,039	0,010	0,018
„ (IV)	3,828	0,047	0,014	0,023

Von den zahlreichen von E. Freund mitgeteilten Analysen seien nur jene hier angeführt, die einen direkten Vergleich mit den von uns ausgeführten zulassen.

---

[1]) l. c.
[2]) l. c.

	Gesamt-N Proz.	Rest-N Proz.	N des $ZnSO_4$-Niederschlages Proz.	N des Gerbsäureniederschlages Proz.	N des Phosphorwolframsäureniederschlages Proz.	N des Phosphorwolframsäurefiltrates Proz.
Serum aus femoralis bei verdauendem Hund Versuch XI	1,02	0,039	0,010	0,014	0,005	0,017
Blut eines gefütterten Hundes Versuch XXX	2,58	0,041	0,004	0,025	0,002	0,014

Diesen positiven Angaben stehen aus jüngster Zeit zahlreiche Mitteilungen von Abderhalden und Oppenheimer[1]), Abderhalden, Funk und London[2]), Abderhalden und Rona[3]) gegenüber, die das Vorkommen von Albumosen im Blutplasma in irgend physiologisch in Betracht kommender Menge leugnen.

Diese Meinungsverschiedenheiten sind wesentlich Folge der benutzten verschiedenen Methodik. Freund und seine Mitarbeiter arbeiten mit Gesamtblut unter Verwendung der Hitzekoagulation und Zinksulfatfällung, Abderhalden und seine Mitarbeiter gehen vom Plasma aus und bedienen sich neuerdings der von Rona und Michaelis[4]) angegebenen Mastixmethode.

Über die Brauchbarkeit dieser Methoden hat sich eine heftige Diskussion entsponnen. E. Freund[5]) glaubt das negative Resultat von Abderhalden zum Teil auf die Verwendung zu kleiner Blutmengen, zum Teil auf durch die Mastixmethode bedingte Verluste beziehen zu sollen, während Abderhalden[6]) den positiven Albumosenbefund Freunds auf ungenügende Auskoagulation namentlich des Hämoglobins zurückzuführen geneigt ist.

Bei dieser Sachlage schien es nicht unerwünscht, noch einmal an einer größeren Zahl von Tieren quantitative Bestimmungen vorzunehmen, wobei besonderer Wert auf eine genau durchgearbeitete Methodik zu legen war.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 155 (1904).
[2]) Ebenda 51, 286 (1907).
[3]) Ebenda 53, 507 (1907).
[4]) Biochem. Zeitschr. II, 219.
[5]) Ebenda VII, 361, 1908.
[6]) Ebenda VII, 360, 1908.

II. Methodisches.

Bei allen Autoren, welche sich mit dem vorliegenden Thema beschäftigt haben, findet man Angaben über die Schwierigkeit einer wirklich vollkommenen Koagulation der Bluteiweißkörper. Besonders leicht mißlingt, wie im hiesigen Laboratorium längst bekannt, die Entfernung des Hämoglobins. Dieses kann nämlich beim Erhitzen schon durch äußerst geringe Mengen Säure unter Bildung von Globin gespalten werden, das manche albumosenähnliche Eigenschaften besitzt und schwer zum Koagulieren zu bringen ist. Bei Blutplasma und Blutserum ist dagegen bei Einhaltung des richtigen Säuregrades leicht tadellose Koagulation zu erreichen. Abderhalden und Oppenheimer halten diesen Umstand für maßgebend. Bei genauer Beobachtung der Acidität haben diese Autoren stets biuretfreie Filtrate erhalten; ja sie sahen das Auftreten bzw. das Ausbleiben der Biuretreaktion im Filtrat als Beweis für die Unvollständigkeit bzw. Vollständigkeit der Koagulation an.

Was von den einzelnen Autoren als der richtige Säuregrad angesehen wird, ist meist nicht näher festgelegt, es findet sich häufig nur die Bemerkung, daß die Koagulationsflüssigkeit schwach essigsauer gemacht wurde. Nur Schütz[1]) gibt an, daß er mit Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion gegen Lackmus, aber noch neutralen gegen Kongopapier angesäuert habe. Vielfach wurde dann noch, um die etwa gebildeten Acidalbumine mit zur Ausfällung zu bringen, unter gleichzeitigem Salzzusatz koaguliert.

Wir verwendeten ausschließlich Blutserum. An die anzuwendende Eiweißausfällungsmethode stellten wir folgende Forderungen:

1. Sie mußte sichere Garantie für vollkommene Koagulation der Bluteiweißkörper geben, also sicher eiweißfreie Filtrate liefern;
2. von dem Verdünnungsgrad des Blutes unabhängig sein;
3. sie durfte auch bei längerer Dauer der Koagulation keine künstliche Vermehrung des Filtratstickstoffs bewirken.

Wir verzichten auf eine Beschreibung von Vorversuchen, in denen wir einerseits durch Variation des Säuregrades zum Ziele zu gelangen suchten, andererseits nach dem Vorgang von Morawitz und Dietschy[2]) unter Zusatz von Alkohol im Wasserbad koagulierten. Wenn wir dabei auch des öfteren wirklich

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 5.
[2]) l. c., S. 3.

eiweißfreie Filtrate bekamen, so war das Ergebnis doch keineswegs konstant.

Die Methode, so wie wir sie schließlich angewendet haben, nachdem sie sich als nach jeder Hinsicht brauchbar, weil den oben aufgestellten Forderungen durchaus entsprechend erwiesen hatte, bestand im wesentlichen darin, daß wir das durch vorsichtiges Schlagen des Blutes und Absitzenlassen der geformten Elemente gewonnene Serum mit einer Mischung gleicher Teile 1 proz. Essigsäure und 5 proz. Monokaliumphosphatlösung bis zur sauren Reaktion gegen Lackmus, aber noch neutralen Reaktion gegen Kongo versetzten, und nach entsprechender Verdünnung mit Wasser unter Zusatz von Kochsalz bis zur Halbsättigung der Gesamtflüssigkeit koagulierten.

Der Spielraum vom Auftreten der sauren Reaktion gegen Lackmus bis zum Auftreten einer Kongoreaktion ist allerdings ein ziemlich großer, somit die Bezeichnung „gegen Lackmus sauer, gegen Kongo noch neutral“ keine sehr scharfe. Die bereits oben angedeuteten Gefahren einer Bildung von löslichen Acidalbuminen bei zu großem Säurezusatz glaubten wir aber hier deshalb nicht so sehr fürchten zu müssen, weil derselbe nur zu einem Teil durch Essigsäure, zum anderen durch saures Kaliumphosphat hergestellt wurde, dem die Fähigkeit, aus Serumeiweiß Acidalbumin zu bilden nahezu abgeht, und da andererseits eventuell gebildetes Acidalbumin durch die großen zugesetzten Salzmengen sicher gefällt wird.

Wie sich im einzelnen die Methode gestaltete, sei an einem Beispiel gezeigt, welches gleichzeitig die schließliche Verdünnung der Koagulationsflüssigkeit so angibt, wie sich uns dieselbe am besten für die Zwecke der Weiterverarbeitung des Filtrates bewährt hat.

Das Serum war durch vorsichtiges Schlagen des Blutes defibriniert. Es wurde dabei wesentlich darauf geachtet, daß nicht infolge Zerstörung von roten Blutkörperchen durch zu starkes Schlagen zu viel Blutfarbstoff ins Serum überging. Aus stark rot gefärbtem Serum ist durch die Koagulation selten ein ganz eiweißfreies und farbloses Filtrat zu erhalten.

Der Alkaleszenzgrad des Blutes von Schlachttieren erwies sich nahezu stets konstant, so daß wir für 50 ccm Serum — die zur Gewinnung brauchbarer Stickstoffzahlen erforderliche Minimalmenge — mit 50 ccm einer Mischung von gleichen Teilen 1 proz. Essigsäure und 5 proz. Kaliumphosphatlösung stets einen genügenden Säuregrad erzielten. Nach Verdünnung mit 300 ccm Wasser wurde durch Zusatz von 400 ccm gesättigter Kochsalzlösung die Flüssigkeit in einem vorher gewogenen Kolben auf Halbsättigung gebracht. Dieselbe blieb dann nach der Koagulation bis zum nächsten Tage stehen. Vor dem Abfiltrieren wurde nochmals gewogen und so das Gewicht des Kolbeninhaltes ermittelt. Durch Wägung von 100 ccm des Filtrates wurde

nun das spezifische Gewicht bestimmt. Zur Berechnung des Reststickstoffs in der verwendeten Serummenge wurde dann beispielsweise der für 100 ccm gefundene Wert mit dem Gesamtgewicht der Flüssigkeit multipliziert und durch das spezifische Gewicht dividiert.

Eine Ungenauigkeit liegt dabei allerdings darin, daß der Gehalt an Substanzen, welche den Reststickstoff repräsentieren im Koagulat und im Filtrat, ebenso wie das Gewicht beider als gleich angenommen wird. Daß aber ein irgendwie in Betracht kommender Fehler nach dieser Richtung hin durch die Versuchsanordnung nicht gegeben sein kann, wird aus dem Folgenden ersichtlich sein. Wir erhielten jedenfalls bei diesem Verfahren mit Wägung bei Kontrollversuchen viel konstantere Werte als nach Koagulation im Meßkolben und nachherigem Auffüllen bis zur Marke bei im übrigen gleichem Verfahren.

Es galt nun zunächst zu prüfen, ob die Methode den oben aufgestellten Forderungen genügte.

Ad. 1. Bei Verwendung von wenig gefärbtem Serum gelang es uns ausnahmslos, ein vollkommen klares und eiweißfreies Filtrat zu erhalten, welches bei nochmaliger Koagulation weder mit noch ohne weiteren Säurezusatz irgend welche Trübung erkennen ließ. Was die weiteren Reaktionen dieses Filtrates anlangt, so ist zu bemerken, daß Essigsäure und Ferrocyankalium keinen Niederschlag erzeugte, Tannin deutliche Fällung gab, während die Probe mit Millons Reagens, mit Quecksilberjodidjodkalium und ebenso die Biuretreaktion im nicht eingeengten Filtrat negativ ausfielen.

Das nach genauer Neutralisation etwa auf $^1/_{10}$ bis $^1/_{20}$ seines ursprünglichen Volumens eingeengte Filtrat ergab dagegen deutliche Biuretreaktion, sehr stark positiv Molischs Reaktion, positive Reaktion mit Millons Reagens, während andererseits mit den Alkaloidreagentien: Pikrinsäure, Jodquecksilberjodkalium, Jodwismutkalium und auch mit Kaliumferrocyanid und Essigsäure eine Reaktion nicht zu erreichen war.

Ad. 2. Entsprechend der oben unter 2 angeführten Forderung haben wir gleiche Blutmengen in den verschiedensten Verdünnungen koaguliert; die dabei künstlich hergestellten Verdünnungsgrade waren jedenfalls derartig gewählt, daß die physiologischen Schwankungen der Blutkonzentration sicher innerhalb der Versuchsanordnung lagen. Falls durch die Gleichsetzung des Gewichtes von Koagulat und Filtrat oder durch einen verschieden starken Gehalt des einen oder des anderen an Substanzen, welche den Reststickstoff ausmachen, ein Fehler der Methode bedingt war, so mußte derselbe hier zum Ausdruck kommen. Es sei von den vielfachen nach dieser Richtung hin angestellten Versuchen der Folgende angeführt:

Verwendete Menge in ccm

	Blut	Essig-säure	5 proz. Kalium-phosphat-lösung	Wasser	Gesättigte Kochsalz-lösung	Gesamt-volumen	Reststick-stoff in 50 ccm Serum
I	50	25	25	50	150	300	0,0199 g
II	50	25	25	100	200	400	0,0199 g
III	50	25	25	200	300	600	0,0207 g
IV	50	25	25	300	400	800	0,0202 g

Die gefundenen Werte zeigen gute Übereinstimmung, die Differenzen liegen innerhalb der Fehlergrenzen der Titration. Die Resultate sind also von der Konzentration des Blutes unabhängig.

Ad. 3. Den Verdacht, daß bei längerer Dauer der Koagulation der Reststickstoff im Filtrat künstlich vermehrt werde, haben wir in nachfolgendem Versuch, bei dem wir unter sonst gleichen Bedingungen lediglich die Koagulationsdauer variierten, einer Prüfung unterzogen.

	Blut	Essig-säure	Kalium-phosphat-lösung	Wasser	Gesättigte Kochsalz-lösung	Gesamt-volumen	Koagu-lations-dauer	Reststick-stoff in 50 ccm Serum
I . .	50	25	25	300	400	600	5 Min.	0,0227 g
II .	50	25	25	300	400	600	20 „	0,0233 g
III .	50	25	25	300	400	600	60 „	0,0222 g

Nach dem Resultat dieses Versuches, durch welchen die vollkommene Unabhängigkeit der gefundenen Werte von der Dauer der Koagulation dargetan war, würde noch die Möglichkeit bleiben, daß im Moment der Koagulation, d. h. also durch diesen Vorgang an sich eine Abspaltung erfolgt. Wenn es nun an sich schon unwahrscheinlich erscheint, daß unter dieser Voraussetzung die abgespaltenen Produkte hinsichtlich ihrer Menge von der Dauer der Koagulation unabhängig sein sollten, so suchten wir diese Frage noch in der Weise zu entscheiden, daß wir die Tanninfällung im koagulierten und im unkoagulierten Serum vornahmen. Erfolgte beim Kochen eine Abspaltung nicht tanninfällbarer Stoffe, so war im Filtrat der Tanninfällung nach dem Kochen eine Zunahme des Reststickstoffes zu erwarten. Das war nun niemals der Fall; der Stickstoffgehalt zeigte in beiden Fällen gute Übereinstimmung. Nach dem Ausfall dieser Vorversuche genügte also die Methode den aufgestellten Forderungen.

Es erschien uns nun weiterhin noch wünschenswert, den Gesamtreststickstoff selbst noch in einzelne Komponenten aufzuteilen, um so ein Bild auch über die Schwankungen der einzelnen Fraktionen unter verschiedenen Bedingungen zu gewinnen. Man konnte daran denken, daß sich vielleicht konstante Beziehungen in der Größe bestimmter Fraktionen mit der Nahrungsaufnahme nachweisen ließen.

Wir gelangten schließlich dazu, im Kochsalzfiltrat durch Tanninfällung einerseits und Harnstoffbestimmung andererseits den Gesamtreststickstoff regelmäßig in drei Komponenten zu zerlegen:

a) einen Tannin fällbaren Anteil,
b) einen Tannin nichtfällbaren Anteil, abzüglich des Harnstoffes,
c) Harnstoff.

Hierzu sei folgendes bemerkt:

In Vorversuchen hatten wir festgestellt, daß für eine bestimmte Quantität Blutserum bei Gegenwart von Essigsäure der Zusatz einer gleichen Menge 4 proz. Tanninlösung[1]) sicher ausreichte, um im Filtrat durch neuerlichen Tanninzusatz keine weitere Fällung mehr auftreten zu lassen. Nach Abscheidung der Serumeiweißkörper bei der Koagulation mußte demnach eine der verwendeten Blutmenge gleiche Quantität 4 proz. Tanninlösung zur Fällung sicher ausreichend sein.

Wir haben also beispielsweise 200 ccm Koagulationsfiltrat entsprechend 15 ccm Serum mit 15 ccm 4 proz. Tanninlösung im Meßkolben versetzt und auf 250 ccm mit Wasser aufgefüllt. Von einem Überschuß an Tannin, in dem nach Angabe einzelner Autoren die gefällten Substanzen teilweise wieder löslich sein sollten, kann wohl kaum die Rede sein, nachdem in dem angeführten Beispiel der Gehalt an Tannin in 250 ccm Flüssigkeit 0,6 g beträgt.

Nach 24 stündigem Stehen wurde im Filtrat vom Tanninniederschlag der Stickstoff in Doppelproben bestimmt. Neben dieser indirekten Bestimmung des tanninfällbaren Anteiles als Differenz zwischen dem Gesamtreststickstoff und dem durch Tannin nicht fällbaren Anteil wurde häufig auch der auf stickstofffreiem Filter gesammelte Niederschlag direkt zur Stickstoffbestimmung verwendet. Die nach beiden Methoden gefundenen Werte zeigten dann gute Übereinstimmung.

Die Harnstoffbestimmung wurde sowohl nach Pflüger-Schoendorff wie nach Mörner-Sjöqvist in dem nach der eben angegebenen Weise erhaltenen Tanninfiltrat ausgeführt.

---

[1]) Tannini purissimi p. analys. — Merck.

Anfänglich ergaben sich bei der Bestimmung nach Pflüger-Schoendorff Schwierigkeiten durch die starke Verdünnung des Filtrates, über welche wir aber dann dadurch hinwegkamen, daß wir bei der Bestimmung nach Pflüger-Schoendorff nach Zusatz von kristallisierter Phosphorsäure den größten Teil der Flüssigkeit erst abdestillierten und den Rückstand dann der Zersetzung bei 155° überließen. Die weitere Bestimmung erfolgte in der gewöhnlichen Weise nach Zusatz von Natronlauge und Destillation mit Magnesia usta.

Für die Verarbeitung des Filtrates nach Mörner-Sjöqvist wurde ein gemessener Teil in flachen Schalen mit kalt gesättigter Chlorbaryumlösung, der auf je 100 ccm 5 g Ätzbaryt zugesetzt waren, bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und dann durch Einleiten von Kohlensäure neutralisiert, die Flüssigkeit dann in einem kräftigen Luftstrom, der vorher zur Entfernung von Ammoniak über vorgelegte Schwefelsäure geleitet wurde, bei 30 bis 40° stark eingeengt. Darnach wurde der Rest mit den ausgeschiedenen Salzmengen quantitativ in einen Kolben gebracht, mit Alkohol-Äthermischung nachgespült, der Kolben mit einem Steigrohr verbunden und im Wasserbade bis zum kurzen Aufkochen des Inhaltes erwärmt, dann in einen Kjeldahlkolben filtriert und noch mehrmals mit Alkoholäther nachgespült. Nach Abdestillieren des Alkoholäthers im Wasserbade wurde im Rückstand der Stickstoff in der gewöhnlichen Weise bestimmt.

Zahlreiche Doppelbestimmungen nach Mörner-Sjöqvist einerseits und nach Pflüger-Schoendorff andererseits zeigten stets eine so vollkommene Übereinstimmung, daß wir uns in einer größeren Anzahl von Fällen mit Doppelbestimmungen nach der einfacheren Methode von Pflüger-Schoendorff begnügen zu dürfen glaubten.

III. Der Reststickstoff hungernder und verdauender Hunde.

Bei der Anstellung nachfolgender Versuche kam es uns vor allem darauf an, festzustellen, ob sich unter physiologischen Verhältnissen, insbesondere beim Vergleich des Blutes von hungernden Tieren und solchen auf der Höhe der Eiweißverdauung konstante Differenzen in der Größe des Gesamtreststickstoffs oder konstante Schwankungen seiner einzelnen Fraktionen in stets gleichem Sinne nachweisen ließen. Da große Differenzen nicht zu erwarten waren, so mußte man die physiologischen Verhältnisse jeweils nach der einen oder anderen Richtung hin möglichst extrem zu gestalten suchen. Wir haben deshalb zur Feststellung der Verhältnisse beim Hungertier das Blut der Tiere (größere Hunde) sieben Tage nach der letzten Nahrungsaufnahme verarbeitet, und andererseits bei Fütterungstieren das Blut sechs bis sieben Stunden nach sehr reichlicher Fleischfütterung entnommen. Es erschien uns besonders wünschenswert, Vergleichszahlen von demselben Tier zu erhalten;

allerdings mußten wir uns hierbei die Frage vorlegen, ob nicht durch den Einfluß wiederholter Aderlässe die Zusammensetzung des Reststickstoffs oder seine Größe überhaupt eine Änderung erfuhr und so die Verhältnisse unübersehbar kompliziert wurden.

Um dieses Bedenken zu beseitigen, haben wir die Versuchsanordnung so gewählt, daß wir einerseits von sechs Hunden, die je dreimal zur Untersuchung kamen, drei zweimal im Hungerzustande, dazwischen einmal auf der Höhe der Verdauung, drei andere zweimal auf der Höhe der Verdauung und dazwischen einmal im Hunger untersuchten. Die jeweils aus einer Femoralarterie entnommene Blutmenge betrug 180 bis 200 ccm, die Pausen bis zur Wiederholung des Aderlasses mindestens 14 Tage, meistens drei mitunter vier Wochen. Bei Einhaltung genügender Pausen zwischen den einzelnen Aderlässen stimmen die beim ersten und dritten Aderlaß gefundenen Zahlen meist gut überein, sind also lediglich davon abhängig, ob sich das Tier im Hunger- oder Verdauungszustande befindet, und sind durch die inzwischen stattgehabten Aderlässe nicht beeinflußt.

I. Gruppe.

Versuch I.

Bulle, gut genährt. Gewicht 15 kg 600 g.

A. 7. Mai 11 Uhr vormittags $1^1/_2$ Pfd. Pferdefleisch verfüttert. $4^1/_2$ Uhr nachmittags 140 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,085 g
Tanninfällbarer Anteil	0,015 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	nicht bestimmt.
Harnstoff	nicht bestimmt.

B. 17. Mai. Nach 7tägigem Hunger. Gewicht 13 kg 50 g. $11^1/_2$ Uhr vormittags 200 ccm Blut aus der linken Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,061 g
Tanninfällbarer Anteil	0,021 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,004 „
Harnstoff	0,035 „

C. 19. Juni $10^1/_4$ Uhr vormittags 2 Pfd. Pferdefleisch verfüttert. Gewicht 15 kg 800 g. $3^1/_2$ Uhr nachmittags 200 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,060 g
Tanninfällbarer Anteil	0,001 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,007 „
Harnstoff	0,052 „

Versuch II.

Wolfshund, gut genährt. Gewicht 11 kg 300 g.

A. 24. Mai $9^1/_4$ Uhr vormittags 350 g Pferdefleisch verfüttert. $3^1/_2$ Uhr nachmittags 200 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,082 g
Tanninfällbarer Anteil	0,020 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,009 „
Harnstoff	0,053 „

B. 12. Juni. Nach 7tägigem Hunger. Gewicht 9 kg 800 g. 11 Uhr vormittags 200 ccm Blut aus der linken Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,041 g
Tanninfällbarer Anteil	0,005 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,005 „
Harnstoff	0,031 „

C. 3. Juli $3^3/_4$ Uhr vormittags 1 Pfd. Pferdefleisch verfüttert. Gewicht 12 kg 300 g. 10 Uhr vormittags aus der linken Carotis entblutet.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,085 g
Tanninfällbarer Anteil	0,009 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,020 „
Harnstoff	0,056 „

Versuch III.

Dogge braun, gut genährt. Gewicht 28 kg 500 g.

A. 10. Juni 9 Uhr vormittags 3 Pfd. Pferdefleisch verfüttert. $3^1/_2$ Uhr nachmittags 200 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,076 g
Tanninfällbarer Anteil	0,001 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,013 „
Harnstoff	0,062 „

B. 29. Juni. Nach 7tägigem Hunger. Gewicht 29 kg 500 g. 10 Uhr vormittags 200 ccm Blut aus der linken Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,032 g
Tanninfällbarer Anteil	0,002 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,009 „
Harnstoff	0,021 „

C. 15. Juli. Gewicht 29 kg 800 g. 9 Uhr vormittags 3 Pfd. Pferdefleisch verfüttert. $3^3/_4$ Uhr nachmittags aus der linken Carotis entblutet.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,078 g
Tanninfällbarer Anteil	0,008 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,010 „
Harnstoff	0,060 „

II. Gruppe.

Versuch IV.

Hühnerhund, gelb. Gewicht 16 kg 300 g.

A. 30. Mai. Nach 7tägigem Hunger. $8^1/_2$ Uhr vormittags 200 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . .	0,060 g
Tanninfällbarer Anteil	0,001 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,009 „
Harnstoff	0,050 „

B. 18. Juni. Gewicht 21 kg 900 g. $9^1/_4$ Uhr vormittags 2 Pfd. Pferdefleisch verfüttert. $3^1/_4$ Uhr nachmittags 200 ccm Blut aus der linken Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . .	0,066 g
Tanninfällbarer Anteil	0,010 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,017 „
Harnstoff	0,039 „

Während der zweiten Hungerperiode exitus.

Versuch V.

Dogge, weiß.

A. Nach 7 tägigem Hunger. Gewicht 25 kg 500 g. 6. Juni $10^1/_2$ Uhr vormittags 200 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . .	0,055 g
Tanninfällbarer Anteil	0,006 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,008 „
Harnstoff	0,041 „

B. 25. Juni. Gewicht 25 kg 600 g. $9^1/_4$ Uhr vormittags $2^1/_2$ Pfd. Pferdefleisch verfüttert. 3 Uhr 50 Min. nachmittags 200 ccm Blut aus der linken Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . .	0,079 g
Tanninfällbarer Anteil	0,001 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,019 „
Harnstoff	0,059 „

C. 17. Juli. Nach 7 tägigem Hunger. Gewicht 22 kg 750 g. 10 Uhr vormittags aus der Carotis entblutet.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . .	0,051 g
Tanninfällbarer Anteil	0,002 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,008 „
Harnstoff	0,041 „

Versuch VI.

Spitz, weiß.

A. 25. Mai. Nach 7 tägigem Hunger. Gewicht 7 kg 820 g. $8^1/_2$ Uhr vormittags 200 ccm Blut aus der linken Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . .	0,073 g
Tanninfällbarer Anteil	0,009 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,001 „
Harnstoff	0,063 „

B. 14. Juni. Gewicht 9 kg 200 g. $9^1/_4$ Uhr vormittags 2 Pfd. Pferdefleisch verfüttert. 4 Uhr nachmittags 200 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . . 0,106 g
Tanninfällbarer Anteil . . . . 0,009 „
Tanninnichtfällbarer Anteil . . . . 0,010 „
Harnstoff . . . . 0,087 „

C. 5. Juli. Nach 7tägigem Hunger. Gewicht 8 kg. 10 Uhr vormittags 180 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . . 0,058 g
Tanninfällbarer Anteil . . . . 0,006 „
Tanninnichtfällbarer Anteil . . . . 0,007 „
Harnstoff . . . . 0,045 „

Bevor wir in eine nähere Betrachtung der erhaltenen Zahlen eingehen, führen wir hier noch einen weiteren Versuch an, dessen Resultat mit dem der bisherigen vollkommen übereinstimmt. Von dem Gedanken ausgehend, daß vielleicht in einem früheren Stadium der Verdauung der Anteil der einzelnen Fraktionen an der Größe des Gesamtreststickstoffs ein anderer wäre, daß sich dabei insbesondere vielleicht höhere Spaltungsprodukte des Eiweiß in vermehrter Menge nachweisen ließen, haben wir die Versuchsanordnung so getroffen, daß wir von drei annähernd gleich großen Hunden die vereinigten Blutmengen einmal im Hunger, das zweite Mal zwei Stunden nach reichlicher Fleischfütterung verarbeiteten.

Versuch VII.

Nach 7tägigem Hunger.

24. Juni. Box, Gewicht 13 kg 800 g. 10 Uhr 20 Min. vormittags 100 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Schnauzer, Gewicht 10 kg 700 g. 10 Uhr 45 Min. vormittags 100 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Spitz, Gewicht 9 kg 300 g. 11 Uhr 15 Min. vormittags 100 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . . 0,042 g
Tanninfällbarer Anteil . . . . 0,009 „
Tanninnichtfällbarer Anteil . . . . 0,007 „
Harnstoff . . . . 0,026 „

10. Juli. Spitz, Gewicht 10 kg 400 g. 5 Uhr nachmittags $1^1/_4$ Pfd. Pferdefleisch verfüttert. 7 Uhr nachmittags aus einer Carotis entblutet.

12. Juli. Schnauzer, Gewicht 10 kg 400 g. 8 Uhr vormittags $1^1/_2$ Pfd. Pferdefleisch verfüttert. 10 Uhr vormittags aus einer Carotis entblutet.

12. Juli. Box, Gewicht 14 kg 750 g. 1 Uhr nachmittags $1^1/_2$ Pfd. Pferdefleisch verfüttert. 3 Uhr nachmittags aus einer Carotis entblutet.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . . 0,073 g
Tanninfällbarer Anteil . . . . 0,013 „
Tanninnichtfällbarer Anteil . . . . 0,012 „
Harnstoff . . . . 0,048 „

Zur besseren Übersicht stellen wir die bisherigen Resultate in nachfolgender Tabelle zusammen:

Hunger. In 100 ccm Serum gefunden

Versuch Nr.	Gesamtrest-N	Tanninfällbarer N	Tanninnichtfällbarer N	Harnstoff-N
I. Bulle	0,061	0,021	0,004	0,035
II. Wolfshund	0,041	0,005	0,005	0,031
III. Dogge, braun	0,032	0,002	0,009	0,021
IV. Hühnerhund	0,060	0,001	0,009	0,050
	—	—	—	—
V. Dogge, weiß	0,055	0,006	0,008	0,041
	0,051	0,002	0,008	0,041
VI. Spitz	0,073	0,009	0,001	0,063
	0,058	0,006	0,007	0,045
VII. 3 Hunde	0,042	0,009	0,007	0,026

Verdauung. In 100 ccm Serum gefunden

Versuch Nr.	Gesamtrest-N	Tanninfällbarer N	Tanninnichtfällbarer N	Harnstoff-N
Blutentnahme 6 bis 7 Stunden nach Fleischfütterung				
I. Bulle	0,085	0,015	—	—
	0,060	0,001	0,007	0,052
II. Wolfshund	0,082	0,020	0,009	0,053
	0,085	0,009	0,020	0,056
III. Dogge, braun	0,076	0,001	0,013	0,062
	0,078	0,008	0,010	0,060
IV. Hühnerhund	0,066	0,010	0,017	0,039
V. Dogge, weiß	0,079	0,001	0,019	0,059
VI. Spitz	0,106	0,009	0,010	0,087
Blutentnahme 2 Stunden nach Fleischfütterung				
VII. 3 Hunde	0,073	0,013	0,012	0,048

Bei der Beurteilung der Zahlenergebnisse unserer Versuchsreihe sehen wir zunächst in sämtlichen Fällen (mit einer einzigen Ausnahme, wo die Zahlen gleich sind) eine absolute Erhöhung des Gesamtreststickstoffs im Blute des verdauenden Tieres gegenüber dem Hungerzustande, die allerdings in weiten Grenzen schwankt: so sehen wir in Versuch IV nur eine Erhöhung von 0,060 g auf 0,066 g und andererseits in Versuch III eine Vermehrung um mehr als das Doppelte, von 0,032 g auf 0,078 g.

Die Mittelzahlen sind für 100 ccm Serum

	Hunger	Verdauung
Gesamtreststickstoff	0,0525 g	0,0788 g

Diese Vermehrung des Reststickstoffs während der Eiweißresorption tritt auch in den Versuchen von Freund und Töpfer, sowie von F. Kraus, wenn auch weniger deutlich zutage. Ein direkter Zahlenvergleich verbietet sich durch den Umstand, daß es sich hier um Gesamtblut, in unseren Versuchen um Serum handelt.

Was nun weiter die einzelnen Fraktionen anlangt, so ist zunächst bemerkenswert, daß in allen Fällen der Hauptanteil des Reststickstoffs vom Harnstoff gebildet wird. Auch hier sind ziemlich weite Schwankungen gegeben,

von 0,021 bis 0,063 g im Hungerblute
und „ 0,039 „ 0,087 „ „ Verdauungsblute.

Die Mittelzahlen sind für 100 ccm Serum

	Hunger	Verdauung
Harnstoff	0,0384 g	0,0567 g

Daß auch beim Menschen der Harnstoff den Hauptanteil des Reststickstoffs ausmacht, geht aus Beobachtungen von Th. Brugsch[1]) hervor. Danach betrug bei Nephritikern der Harnstoff im Mittel 81 Proz. des Reststickstoffs und das Blut eines gesunden Menschen und zweier Apoplektiker ergab ähnliche Durchschnittswerte.

Die Steigerung des Harnstoffgehaltes beträgt somit während der Eiweißresorption etwa 50 Proz. Ähnliche Zahlen haben auch Freund und Töpfer in den angeführten Versuchen — allerdings nicht an demselben Tier — erhalten, 0,026 g beim hungernden, 0,041 g beim verdauenden Tier.

Daß diese Vermehrung des Harnstoffs im Blute der Periode vermehrter Ausscheidung im Harn entspricht, wie sie von C. Voit und seinen Schülern nachgewiesen wurde, braucht kaum hervorgehoben zu werden.

Von Interesse ist der Vergleich der Mittelwerte des Harnstoffs zum Gesamtreststickstoff. Es zeigt sich da ein beinahe konstantes Verhältnis des prozentualen Anteiles des Harnstoffs am Gesamtreststickstoff, der sowohl im Hunger wie in der Verdauung 73 Proz. beträgt.

Was nun die übrigen Komponenten des Reststickstoffs anlangt, die also sowohl im Verdauungs- wie auch im Hungerserum im Mittel zusammen 27 Proz. desselben ausmachen, so ergibt sich, wenn wir die Mittelzahlen nehmen, daß im Hungerblut diese

---

[1]) Medizinische Klinik 2, 295 (1906).

beiden Fraktionen einander gleich sind, im gefütterten Blut dagegen die zweite Fraktion bei weitem überwiegt. Das Verhältnis war

im Hunger	während der Verdauung
10 : 10	10 : 16

Ebenso deutlich kommt die Vermehrung der durch Tannin nicht fällbaren Substanzen im Verdauungsblut zum Ausdruck, wenn wir die absoluten Zahlen einander gegenüber stellen. Es zeigt sich in sämtlichen Versuchen eine Vermehrung gegenüber dem Hungerblut und zwar um 82 Proz. im Mittel.

Im Gegensatz hierzu zeigt die Fraktion der tanninfällbaren Körper ein inkonstantes Verhalten. Es zeigte sich zwar in einigen Versuchen eine deutliche Zunahme, in anderen aber eine ebensolche Abnahme.

Die Bedeutung dieses Verhaltens ist insofern nicht leicht zu beurteilen, als die Natur der in diesen Fraktionen enthaltenen Stoffe nicht genügend ermittelt ist. Doch ist sicher, daß in der Tannin fällbaren Fraktion etwa vorhandene Albumosen, in der nichtfällbaren die Aminosäuren und sonstigen nicht durch Tannin fällbaren Endprodukte — von Harnstoff abgesehen — fallen müssen. Da eine konstante Vermehrung der Albumosenfraktion nicht nachweisbar ist, wird man nicht wohl eine Vermehrung der albumosenähnlichen Stoffe beim verdauenden Tiere annehmen. Die Anwesenheit der geringen Menge von Biuretreaktion gebenden Stoffen im Serum, an der wir auf Grund unserer Versuche festhalten müssen, steht sonach mit der Eiweißresorption nicht in einem erkennbaren Zusammenhang. Auch darf es nicht als ausgemacht angesehen werden, daß die Biuretreaktion gebenden Körper den Verdauungsalbumosen angehören, da es sich auch um albumosenähnliche Stoffwechselprodukte anderer Art handeln könnte.

Wir möchten allerdings ausdrücklich hervorheben, daß sich unsere Schlußfolgerungen nur auf das Serum beziehen, und daß sie nicht zu Schlüssen auf den Albumosen- oder Peptongehalt des Gesamtblutes berechtigen. Für dieses haben E. Freunds und seiner Mitarbeiter Versuche viel höhere N-Werte der Albumosenfraktion ergeben, wobei allerdings eine ähnliche Inkonstanz wie in unseren Versuchen auffällt.

Die regelmäßig von uns gefundene Vermehrung des durch Tannin nicht fällbaren Stickstoffanteiles — immer abgesehen von Harnstoff — legt die Vorstellung nahe, daß hier ein Transport von Eiweißendprodukten vom Darm zu den Organen vorliegt. Es

handelt sich um eine Steigerung von 0,0060 g N im Hungerserum auf 0,0130 g im Verdauungsserum. Diese Mittelwerte geben einen ungefähren Anhaltspunkt für die Menge der etwa im Blutserum auftretenden Aminosäuren, die ja insgesamt unter die nicht tanninfällbaren Eiweißendprodukte fallen. Eine Vermehrung um 0,007 g N in 100 ccm würde z. B. einem Gehalt von nur 0,0705 g Leucin, etwa ebensoviel Glutaminsäure, aber viel weniger Glycin entsprechen. Im Hinblick auf die Bemühungen, die Verdauungsendprodukte direkt im Blute aufzusuchen, ist es vielleicht nützlich, auf die Kleinheit dieser Werte hinzuweisen, wobei noch zu bedenken ist, daß im Falle einer Resorption von Endprodukten nicht bloß eine einzige Aminosäure, sondern eine ganze Anzahl nebeneinander in entsprechend kleinerer Menge in Betracht käme.

Es erscheint daher nicht sehr aussichtsvoll, auf diesem Wege den Verdauungsprodukten im Kreislauf nachzugehen. Ein später anzuführender Versuch mit Darreichung von Verdauungsendprodukten ließ uns überdies nicht einmal eine sichere Zunahme der Aminosäurenfraktion im Blute erkennen.

IV. Versuche über Albumosen- und Peptonresorption und Schlußbemerkungen.

Wenn wir die vorstehenden Versuchsergebnisse zusammen fassen, so ergibt sich für den mit Fleisch gefütterten Hund gegenüber dem inanierenden eine Zunahme des Harnstoffs um 59 Proz., eine Zunahme der durch Tannin nicht fällbaren Körper um 82 Proz., ein inkonstantes Verhalten der tanninfällbaren Körper — Albumosenpeptonfraktion.

Es fragt sich nun, welche physiologische Bedeutung diesen Zahlen zukommt.

Betreff der Herkunft der am Reststickstoff beteiligten Stoffe liegen drei Möglichkeiten vor:

1. Es handelt sich um Abbauprodukte, die einer weiteren Verwendung im Organismus nicht mehr zugänglich und endgültig zur Ausscheidung bestimmt sind. Hier kommt fast ausschließlich der Harnstoff in Betracht.

2. Es handelt sich um stickstoffhaltige Produkte des
   1. im Darm oder aber
   2. in den Geweben erfolgten Eiweißabbaues.

Die Verfolgung der im Darm entstehenden Abbauprodukte bei und nach ihrem Übertritt in das Blut ist seit Jahren Gegenstand unverdrossener Arbeit gewesen.

Um dieser Frage auch unsererseits näher zu treten, verfütterten wir zunächst bei zwei Hunden ein stickstoffhaltiges Material, das sehr reich war an Albumosen und zwar an Deuteroalbumosen.

Wir gewannen dasselbe für den nachfolgenden Versuch VIII in der Weise, daß 200 g Witte-Pepton mit 6 Liter 50proz. Alkohol zwei Tage digeriert und dann filtriert wurde. Das Filtrat wurde dann nach Verjagen des Alkohols auf dem Wasserbade auf etwa 400 ccm eingeengt, der Rückstand mit dem 10fachen Volumen absolutem Alkohol gefällt. Der hierbei entstandene Niederschlag wurde in wenig Wasser gelöst und mit Bouillon gemischt verfüttert. Er bestand zum größeren Teil aus tanninfällbaren Deuteroalbumosen.

Wir gingen dabei von dem Gedanken aus, daß, wenn wir einem Hunde auf einmal eine übergroße Menge von Albumosen zuführten, eine etwaige Resorption derselben in einer besonderen Erhöhung der tanninfällbaren Fraktion zum Ausdruck kommen konnte, wobei die Blutentnahme natürlich schon sehr früh, eine Stunde nach Einführung dieser Albumosen, zu erfolgen hatte. Dabei war es nötig, um Vergleichswerte zu schaffen, dieselben Hunde vorher auf der Höhe der Fleischverdauung zu untersuchen. Die Resultate dieser beiden Versuche sind folgende:

Versuch VIII.

Dachshund, Gewicht 9 kg 750 g.

1. Juli. 10 Uhr vormittags 1 Pfd. Pferdefleisch verfüttert. 4 Uhr nachmittags 200 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . .	0,086 g
Tanninfällbarer Anteil	0,005 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,014 „
Harnstoff	0,067 „

24. Juli. Nach 36stündigem Hunger. 10 Uhr 45 vormittags von nach oben gemachter Angabe bereiteten Lösung

	Verfüttert im Ganzen	11,2 g N
davon		
	tanninfällbar	6,72 „ „
	tanninnichtfällbar	4,48 „ „

11 Uhr 45 vormittags aus der Carotis entblutet. Magen- und Dünndarminhalt entleert und analysiert. Wiedergefunden im

	Magendarminhalt	6,51 g N
davon		
	tanninfällbar	1,23 „ „
	tanninnichtfällbar	5,28 „ „

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum . .	0,066 g
Tanninfällbarer Anteil	0,008 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,007 „
Harnstoff	0,051 „

Versuch IX.

Dogge, grau. Gewicht 28 kg 500 g.

5. Juli. 10 Uhr vormittags $3^1/_2$ Pfd. Pferdefleisch verfüttert. 5 Uhr nachmittags 200 ccm Blut aus der rechten Femoralarterie entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,079 g
Tanninfällbarer Anteil	0,012 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,012 „
Harnstoff	0,055 „

26. Juli. Gewicht 31 kg 850 g. Nach 48stündigem Hunger von einem in gleicher Weise wie bei Versuch VIII bereiteten Gemisch verfüttert 11 Uhr 45 Min. vormittags

	im Ganzen	40,8 g N
davon		
	tanninfällbar	23,3 „ „
	tanninnichtfällbar	17,5 „ „

2 Uhr 25 Min. nachmittags aus einer Carotis entblutet. Magen- und Dünndarminhalt analysiert. Wiedergefunden im Magendarminhalt

	im Ganzen	29,4 g N
davon		
	tanninfällbar	2,058 „ „
	tanninnichtfällbar	27,342 „ „
	Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,069 g
	Tanninfällbarer Anteil	0,012 „
	Tanninnichtfällbarer Anteil	0,006 „
	Harnstoff	0,051 „

Es ergab sich also bei diesen Fütterungsversuchen keine bemerkenswerte Erhöhung der Albumosenfraktion gegenüber den Standardzahlen nach Fleischfütterung, so daß sich daraus ein vermehrter Übertritt von unveränderten Deuteroalbumosen in das Blut nicht entnehmen läßt. Um uns zu überzeugen, wieviel von dem eingeführten Material zur Zeit der Blutentnahme resorbiert war, analysierten wir in diesen Versuchen die noch im Magendarmkanal befindliche Lösung und fanden in dem ersten Falle von 11,2 g eingeführtem N 6,5 g wieder, im zweiten Falle von 40 g N wieder 29,4 g. Also war doch schon ein relativ großer Teil nach einer Stunde zur Resorption gelangt.

Auffallend war, daß von dem tanninfällbaren Anteil des Nahrungsgemisches nur noch ganz geringe Mengen im Magendarmkanal vorhanden waren, während die Menge der durch Tannin nicht fällbaren Körper größer war als überhaupt dem Tier zugeführt worden war. Das deutet darauf hin, daß die von uns eingeführten Deuteroalbumosen ganz außerordentlich schnell und leicht von den Verdauungssäften angegriffen und abgebaut werden.

In ganz ähnlicher Weise dachten wir durch eine ganz abundante Zufuhr von nicht mehr durch Tannin fällbaren Eiweißabbau-

produkten eine Erhöhung der durch Tannin nicht fällbaren (Aminosäuren-) Fraktion zu erreichen. Aber auch hier war das Resultat dasselbe wie im ersten Falle.

Das verfütterte Verdauungsgemisch war in der Weise hergestellt, daß Witte-Pepton während sechs Wochen unter Toluol und Pankreatin der künstlichen Verdauung überlassen war.

Versuch X.

Colli, Hündin. 8 Tage Hunger.

10. Juli. 200 ccm aus der Arteria femoral. entnommen.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm	0,045 g
Tanninfällbarer Anteil	0,008 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,006 „
Harnstoff	0,031 „

30. Juli. Fütterung mit einem Verdauungsgemisch

	im Ganzen	34,3 g N
davon	tanninfällbar	4,2 „
	tanninnichtfällbar	30,1 „

Blutentnahme 4 Stunden nach der Fütterung.

Gesamtreststickstoff in 100 ccm Serum	0,083 g
Tanninfällbarer Anteil	0,016 „
Tanninnichtfällbarer Anteil	0,016 „
Harnstoff	0,051 „

Es wäre natürlich nicht richtig, aus dem Umstande, daß sich nach Verfütterung dieses Verdauungsgemisches keine besondere Erhöhung der Blutfraktion nachweisen läßt, den Schluß zu ziehen, daß keine Resorption von Endprodukten erfolgt ist. Es liegt im Gegenteil gar kein Grund vor, daran zu zweifeln, daß wenigstens zum Teil die von uns konstant gefundene Stickstoffzunahme in der zweiten Fraktion auf solche Spaltprodukte zu beziehen ist, die vom Darm aus in das Blut übertreten.

Daß trotz nachweisbar erfolgten Verschwindens der verfütterten Substanz aus dem Darm und im Gegensatz zu dem von Borchard[1]) für die Hemielastose gelieferten Nachweis, daß die Albumosennatur einer Substanz deren Übertritt aus dem Darm in die Blutbahn nicht verhindert, in unseren Fällen die Resorption von Albumosen und von Endprodukten ohne sicher nachweisbaren Einfluß auf die Verhältnisse des Reststickstoffs blieb, ist gegenwärtig einer befriedigenden Erklärung nicht zugänglich.

Auf einen Punkt möchten wir noch näher hinweisen, da er mehr Beachtung zu verdienen scheint, als er bisher gefunden hat, das ist die Anwesenheit derselben Fraktionen des Reststickstoffs im Hunger-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 51, 506 (1907).

blut wie im Verdauungsblut. Die oben ermittelte Tatsache, daß beim Hunde nach tagelanger Inanition der Gehalt des Serums an Reststickstoff — von Harnstoff abgesehen — nicht viel geringer ist als beim gut genährten und in voller Verdauung befindlichen Tier, kann nicht wohl anders als im Sinne eines auch im Hunger fortbestehenden durch das Blut vermittelten intermediären Stoffwechsels von Organ zu Organ aufgefaßt werden. Welcher Art diese Stoffe sind, ist freilich nicht festgestellt; bei der Verbreitung proteolytischer Fermente in den Geweben ist aber nicht ausgeschlossen, daß sie qualitativ den vom Darm aus resorbierten Albumosen, Peptonen und Aminosäuren nahestehen und es ist denkbar, ja wahrscheinlich, daß die Ernährung der Organe im Hunger — auch wenn man nicht wie Freund eine ausgiebige Fortdauer der Verdauungsvorgänge während des Hungers annimmt — nur quantitativ, nicht aber qualitativ von der normalen Ernährungsweise verschieden ist. Daß diese im Blut konstant vorkommenden Komponenten des Reststickstoffs die Auffindung der bei der Darmresorption zuströmenden erheblich erschweren müssen, ist einleuchtend.

Über die Größe dieses Teiles des intermediären Stoffwechsels liegen freilich keine genauen Angaben vor. Wenn man aber die Untersuchungen von Miescher über das Wachstum der Ovarien auf Kosten der Muskulatur beim laichenden Lachs, die analogen Beobachtungen von Pflüger an der Geburtshelferkröte, die Studien von Ver Eecke am kindlichen Organismus, wonach dieser im fötalen Leben hauptsächlich auf Kosten des mütterlichen Organeiweißes wächst, ins Auge faßt, wenn man ferner die im normalen Organismus an manchen Stellen, z. B. in den lymph- und blutbildenden Organen, den Geschlechtsorganen, nachweisbare lebhafte Zellproliferation, sowie die Größe des täglichen Blutzerfalles — vgl. Hofmeister bei Goodmann[1]) — in Betracht zieht, so wird man kaum geneigt sein, diesen intermediären Stoffwechselvorgängen eine nur nebensächliche Bedeutung zuzuschreiben. Für eine quantitative Beurteilung dieser Verhältnisse ist aber die genauere Kenntnis der bisher unbekannten Komponenten des Reststickstoffs eine unabweisbare Voraussetzung.

Über die Natur dieser Stoffe stehen weitere Mitteilungen in Aussicht.

---

[1]) Diese Beiträge 9, 101.

Kürzere Mitteilungen.

9. Einige Bemerkungen zu der Mitteilung von Friedmann „Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper“.

Von H. D. Dakin.

(Aus dem Laboratorium des Herrn Dr. C. A. Herter, New York.)

In Band XI, S. 151 bis 202 dieser Beiträge findet sich eine Anzahl wichtiger Untersuchungen von Friedmann über das Schicksal von Karbonsäuren im tierischen Organismus. In diesen Schriften kritisiert Friedmann das von Knoop ausführlich begründete Prinzip der physiologischen β-Oxydation. Er schreibt: „Von rein chemischen Gesichtspunkten setzt sich aber die Annahme eines Oxydationsangriffes in β-Stellung zur Karboxylgruppe in Widerspruch zu den Tatsachen, die über Oxydation, Substitution und Kondensation von normalen Fettsäuren bekannt sind, da nur die Wasserstoffatome des α-Kohlenstoffs sich als reaktionsfähig erwiesen haben und keine Beobachtung vorliegt, daß die Wasserstoffatome am β-Kohlenstoffatom überhaupt reaktionsfähig sind. Es kann daher die Annahme eines Oxydationsangriffes in β-Stellung zur Karboxylgruppe nicht als eine chemische Erklärung der von Knoop ermittelten Gesetzmäßigkeiten beim Abbau der aromatischen Fettsäuren angesehen werden, wenigstens nicht in dem Sinne einer Zurückführung auf bekannte chemische Analogien. Ferner ist darauf hinzuweisen, daß es nicht bewiesen und nach chemischen Analogien unwahrscheinlich ist, daß die zuerst einsetzenden Vorgänge, die sich beim physiologischen Abbau der Fettsäuren abspielen, Oxydationsprozesse sind.“

Weiter auf S. 203: „Dagegen steht die Deutung eines Überganges von Buttersäure in β-Oxybuttersäure als direkte Hydroxylierung eines in β-Stellung zur Karboxylgruppe stehenden Wasserstoffatoms einer normalen Fettsäure in Widerspruch zu dem chemischen Verhalten normaler Fettsäuren. Die Bildung von β-Oxybuttersäure kann sich daher nur auf Umwegen vollziehen.“

Ich wünsche die Aufmerksamkeit auf die Tatsache zu lenken, daß im Gegensatz zu Friedmanns Annahme, die vermißte chemische Analogie für die Reaktionen, welche die β-Oxydation in sich schließt, in der Tat existiert. Ich habe gezeigt, daß normale Buttersäure durch Wasserstoffsuperoxyd unter Bildung von Acetessigsäure, Aceton und

anderen Substanzen oxydiert wird [1]). Die Ausbeute an Aceton mag 50 Proz. der theoretischen Menge betragen. Wahrscheinlich wird daher zuerst β-Oxybuttersäure gebildet und dann durch Wasserstoffsuperoxyd unter Bildung von Acetessigsäure [2]) weiter oxydiert. Alle bis jetzt untersuchten Säuren von der Buttersäure bis zur Stearinsäure werden in gleicher Weise oxydiert. Caprylsäure gibt somit Methyl-n-Amylketon, Caprinsäure Methyl-n-Heptylketon, Laurinsäure [3]) Methyl-n-Nonylketon, während Stearinsäure in Methyl-n-Quindekylketon übergeht [4]). In jedem Falle werden die Wasserstoffatome am β-Kohlenstoffatom zuerst oxydiert. Die Reaktion kann in folgender Weise ausgedrückt werden:

$$R.CH_2.CH_2.COOH \longrightarrow R.CH(OH).CH_2.COOH$$
$$\longrightarrow R.CO.CH_2.COOH \longrightarrow R.CO.CH_3 + CO_2$$

In betreff der physiologischen Oxydation der Phenylpropionsäure zu Benzoesäure (und anderer ähnlicher Reaktionen) bemerkt Friedmann (S. 103), die „Knoopsche Vorstellung der β-Oxydation ist zur Deutung dieser Tatsachen entbehrlich“. Demgegenüber habe ich mitzuteilen, daß ich bei weiterer Untersuchung des Schicksals der Phenylpropionsäure im Tierkörper neben der Entstehung und Ausscheidung von Benzoesäure (Hippursäure) durch den Harn das Auftreten von Phenyl-β-Oxypropionsäure und Acetophenon feststellen konnte:

$$C_6H_5.CH_2.CH_2.COOH \longrightarrow C_6H_5.CH(OH).CH_2.COOH$$
$$\longrightarrow C_6H_5.CO.CH_2.COOH \longrightarrow C_6H_5.CO.CH_3 + CO_2 \longrightarrow C_6H_5.COOH$$

Dieses Resultat ist der deutlichste Beweis des Vorkommens der β-Oxydation im Tierkörper und macht es sehr wahrscheinlich, daß „die zuerst einsetzenden Vorgänge, die sich beim physiologischen Abbau der Fettsäuren abspielen, Oxydationsprozesse sind“.

Mit rein chemischen Mitteln (nämlich mittels Wasserstoffsuperoxyd) ist es mir weiter gelungen, Phenylpropionsäure unter Bildung von Acetophenon, und ferner ebenso Acetophenon unter Bildung von Benzoesäure zu oxydieren — Reaktionen, welche in gleicher Weise im tierischen Organismus verlaufen können.

Ich komme deshalb, entgegen Friedmanns Ansicht, zu dem Schluß, daß tierische Oxydation von Fettsäuren und phenylierten Fettsäuren wenigstens teilweise in β-Stellung stattfindet, und daß diese Art Umwandlung in engster Analogie mit chemischen Reaktionen steht, wie sie außerhalb des Organismus zu erhalten sind.

---

[1]) Journ. Biol. Chem. 4, 77 (1908).
[2]) Ebenda, S. 97 (1908).
[3]) Ebenda, S. 221 (1908).
[4]) Ebenda, S. 233 (1908).

New York, 23. März 1908.

10. Notiz über die α-Chlor-β-Imidazolylpropionsäure.

Von **A. Windaus** und **W. Vogt.**

(Aus der med. Abt. des chem. Laboratoriums der Universität Freiburg i. Br.)

Gelegentlich synthetischer Versuche in der Imidazolreihe wollten wir uns die „Chlorhistinkarbonsäure" (α-Chlor-β-Imidazolylpropionsäure) nach den Angaben von S. Fränkel[1]) bereiten. Fränkel beschreibt die Darstellung dieser Verbindung folgendermaßen:

„5 g feingepulvertes Histidinchlorhydrat wurden in 50 g rauchender Salzsäure verteilt; dazu wurden unter Eiskühlung und stetem Rühren 5 g Natriumnitrit in konzentrierter wässeriger Lösung tropfenweise zugefügt. Die Lösung blieb mehrere Stunden bei Zimmertemperatur stehen, dann wurde Luft durchgeblasen und nun die fast farblose Flüssigkeit über Glaswolle vom Kochsalz abfiltriert, zur Trockne verdampft, mit Alkohol von 95 Proz. aufgenommen, vom auskristallisierenden Kochsalz getrennt und eingeengt. Der restierende Sirup war nicht zur Kristallisation zu bringen, er löste sich in jedem Verhältnis in Alkohol und Wasser, war unlöslich in Äther, löslich in Eisessig. — Der in Eisessig gelöste Sirup wurde mit Zinkstaub reduziert, die abfiltrierte Flüssigkeit mittels Schwefelwasserstoff vom Zink befreit, mit Silberacetat versetzt, filtriert, wiederum mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert und zur Kristallisation eingeengt; die Kristalle aus Wasser umkristallisiert. Centimetergroße, wasserklare Tafeln, F. 80°." Diese Tafeln enthalten nach Fränkel 1 Mol. Kristallwasser, das bei 120° entweicht.

Welchen Zweck bei dieser Vorschrift die Behandlung des ersten Reaktionsproduktes mit Zinkstaub und Essigsäure verfolgt, ist nicht recht verständlich; diese Reaktion ist um so merkwürdiger, da weiter von Fränkel angegeben wird, daß die Chlorhistinkarbonsäure durch Kochen mit Zinkstaub und Wasser reduziert und in die „Histinkarbonsäure" (β-Imidazolylpropionsäure) verwandelt werde.

Trotz dieser Bedenken haben wir die Darstellung der Chlorhistinkarbonsäure nach den Angaben von Fränkel versucht, doch haben wir hierbei niemals etwas anderes als die chlorfreie Imidazolylpropionsäure erhalten; und dieses Resultat blieb unverändert, selbst als wir nach einer brieflichen Vorschrift des Herrn S. Fränkel arbeiteten, in

---

[1]) Diese Beiträge 8, 158.

welcher Zeitdauer und Temperatur bei der Einwirkung des Zinkstaubes genauer angegeben waren. Wir haben eine große Anzahl verschiedener Versuche ausgeführt und können mit Bestimmtheit angeben, daß nach der Fränkelschen Vorschrift zur Bereitung der „Chlorhistinkarbonsäure" nicht diese, sondern die β-Imidazolylpropionsäure entsteht. Die Ausbeute ist hierbei so vorzüglich (65 Proz. der theoretischen), daß das Verfahren zur Bereitung großer Mengen Imidazolylpropionsäure sehr bequem ist.

Wir haben uns dann die „Chlorhistinkarbonsäure" auf einem anderen Wege und ohne Verwendung von Zinkstaub bereitet:

Das Histidin [1]) wurde genau nach den Angaben von Fränkel mit konzentrierter Salzsäure und Natriumnitrit behandelt; nach Entfernung des Kochsalzes und Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand, der aus dem Chlorhistinkarbonsäurechlorhydrat besteht, durch vierstündiges Kochen mit 10 proz. alkoholischer Salzsäure verestert; aus der konzentrierten alkoholischen Lösung wurde das salzsaure Salz des Chlorhistinkarbonsäureesters mittels Äther ausgefällt; das salzsaure Salz wurde in wenig Wasser gelöst, der Ester durch Pottasche frei gemacht, mit Äther aufgenommen und durch ätherische Oxalsäure als Oxalat abgeschieden. Das Oxalat wurde abfiltriert und aus Methylalkohol umkristallisiert. Es bildet vierseitige, aufeinander geschichtete Blättchen, die beim Erhitzen im Schmelzpunktsröhrchen bei 161° schmelzen.

Aus dem Oxalat wurde der Ester in der üblichen Weise bereitet und hierbei als nicht kristallisierendes Öl erhalten; um ihn in die freie α-Chlor-β-Imidazolylpropionsäure zu verwandeln, wurde er durch mehrstündiges Kochen mit n-Schwefelsäure verseift, dann wurde die Schwefelsäure mittels Ätzbaryt genau entfernt und die Lösung im Vakuum eingedampft. Hi rbei kristallisiert die Chlorhistinkarbonsäure in kleinen derben Prismen, die sich als harte Kruste am Boden des Gefäßes absetzen.

Die lufttrockene Chlorhistinkarbonsäure enthält kein Kristallwasser; beim Erhitzen im Schmelzpunktsröhrchen schmilzt sie bei 191° unter Zersetzung; sie ist ziemlich leicht löslich in Wasser, sehr wenig löslich in Alkohol, unlöslich in Aceton und Äther. Aus einem Gemisch von Wasser und Aceton läßt sie sich leicht umkristallisieren:

Analyse:

0,1842 g Substanz gaben 0,2801 g CO_2 und 0,0736 g H_2O,
0,1577 g „ „ 22,4 ccm N (19° 759 mm),
0,1991 g „ „ 0,1602 g AgCl.

$C_6H_7N_2O_2Cl$

	C	H	N	Cl
Berechnet	41,25	4,04	16,09	20,31
Gefunden	41,47	4,47	16,23	19,90

Die auf diesem Wege bereitete Chlorhistinkarbonsäure ist also bestimmt völlig verschieden von der Fränkelschen Substanz. Sie besitzt

---

[1]) Das Histidin haben wir in guter Qualität von der Firma Dr. Th. Schuchardt in Görlitz bezogen.

einen um 110° verschiedenen Schmelzpunkt und enthält kein Kristallwasser; auch die Löslichkeitsverhältnisse sind andere. Beim Erwärmen mit Zinkstaub und Essigsäure — ein Verfahren, das Fränkel zur Darstellung der Chlorhistinkarbonsäure benutzt — geht sie glatt in β-Imidazolylpropionsäure über; ja selbst durch Behandeln mit Silberacetat wird die Chlorhistinkarbonsäure zersetzt.

Die von Fränkel als „Chlorhistinkarbonsäure" beschriebene Substanz ist also bestimmt — trotz der publizierten analytischen Daten — etwas anderes gewesen. Durch einen Zufall haben wir festzustellen vermocht, welche Substanz Fränkel in Händen gehabt hat. Gelegentlich beobachteten wir nämlich, daß das salzsaure Salz der Imidazolpropionsäure bei 80° schmilzt und erinnerten uns, daß dies der von Fränkel für seine Chlorhistinkarbonsäure angegebene Schmelzpunkt ist. Wir haben darum das Imidazolylpropionsäurechlorhydrat genauer untersucht und festgestellt, daß es tatsächlich alle Eigenschaften besitzt, die Fränkel der Chlorhistinkarbonsäure zuschreibt. Es kristallisiert in großen durchsichtigen Tafeln, es ist löslich in Wasser und auch in Alkohol, unlöslich in Äther. Es schmilzt lufttrocken bei 80° und verliert beim Erhitzen (genau wie Fränkel angibt) 1 Mol. Kristallwasser.

1,0768 g Substanz (luftrocken) verloren bei 105° 0,0972 g H_2O.

$C_6H_9O_2N_2Cl\,H_2O$

Berechnet . . . . 1 H_2O = 9,26 Proz.
Gefunden . . . . 9,03 „

Es ist also höchst wahrscheinlich, daß Fränkels „Chlorhistinkarbonsäure" nichts anderes ist als Imidazolylpropionsäurechlorhydrat. In den analytischen Zahlen finden sich folgende Differenzen:

	C	H	N	Cl
$C_6H_7O_2N_2Cl$ (Chlorhistinkarbonsäure)	41,25	4,04	16,09	20,31
$C_6H_9O_2N_2Cl$ (Imidazolylpropionsäurechlorhydrat)	40,77	5,14	15,90	20,08
Fränkels Analyse ergab	41,22	4,01	15,90	—

Fränkel fand also merkwürdigerweise über 1 Proz. Wasserstoff zu wenig.

Wie ist nun der Irrtum Fränkels zu erklären? Oben haben wir festgestellt, daß man bei genauem Befolgen seiner Vorschrift β-Imidazolylpropionsäure erhält. Der Befund von Fränkel läßt sich nur so verstehen, daß er (entgegen seinen Angaben) die Salzsäure aus dem Reaktionsgemisch nicht völlig entfernt hat und dann das Imidazolylpropionsäurechlorhydrat wegen seines Chlorgehaltes mit der „Chlorhistinkarbonsäure" verwechselt hat.

11. Zur Frage der Schwefelwasserstoffbildung aus Eiweiß und Schwefel.

Von Dr. med. **Herm. Hildebrandt,**
Privatdozent a. d. Universität Halle a. S.
(Aus dem Pharmakologischen Institut zu Halle a. S.)

Von Rösing[1]) war die Angabe gemacht worden, daß Antiseptica, falls sie nicht das Eiweiß fällen, ohne Einwirkung auf die Schwefelwasserstoffbildung aus Eiweiß und Schwefel sind. A. Heffter[2]) jedoch fand, daß die mittels Phenol aus Eiweiß erhaltenen Niederschläge die H_2S-bildende Fähigkeit nicht eingebüßt haben.

Beim Tannothymal — einem Kondensationsprodukt aus Thymol, Formaldehyd und Tannin —, welchem vermöge seiner Tanninkomponente eiweißfällende und dementsprechend adstringierende Wirkungen zukommen, vermißte ich gleichfalls die Eigenschaft, jenen Vorgang aufzuheben. Das Tannin, das ja in evidenter Weise Eiweiß fällt, störte ebenfalls nicht die Fähigkeit des Eiweißes, den Schwefel zu reduzieren. In einer Eiweißlösung, die einen Zusatz von 2 Proz. Tannin erhielt, war sicher alles Eiweiß ausgefällt, da im klaren Filtrate keine Eiweißreaktion, wohl aber noch Tanninreaktion mit Eisenchlorid erhalten wurde, und dennoch blieb hier die Fähigkeit, mit Schwefel Schwefelwasserstoff zu bilden, unverändert. Es erinnert diese Tatsache an die Beobachtung Heffters, wonach gekochtes oder mit Alkohol behandeltes Eiweiß die reduzierende Fähigkeit auf Schwefel keineswegs eingebüßt hat. Dagegen hatte schon Rösing gefunden, daß die reduzierende Wirkung des Eierklars auf Schwefel durch kleine Mengen oxydierender Agentien, Kaliumpermanganat, Jod, Ferricyankalium aufgehoben wird, und Heffter fand das Gleiche für Ferrichlorid und Kupfersulfat.

Wenn man zu einer verdünnten Eiweißlösung einen Zusatz von 0,06 Proz. Sublimat macht, so tritt eine nicht unbeträchtliche Ausscheidung von durch den Sublimat verändertem Eiweiß ein; ein Teil aber bleibt in Lösung, da das klare Filtrat noch Eiweißreaktion zeigt, ist jedoch durch die Gegenwart des zugesetzten Sublimats der Fähigkeit beraubt worden, aus zugesetztem Schwefel Schwefelwasserstoff zu bilden.

Bringt man das in Lösung befindliche Eiweiß durch Alkohol zur Ausfällung, um es von freiem Sublimat zu befreien, trocknet es und

---

[1]) Inaug.-Diss. Rostock 1891.
[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5 (1904).

stellt nun die Reaktion mit Schwefel an, so ergibt sich, daß auch jetzt die Fähigkeit, den Schwefel in Schwefelwasserstoff überzuführen, verloren gegangen ist.

Auch dieser Versuch beweist, daß es nicht die Eigenschaft einer Substanz, Eiweiß zu fällen, ist, welche das Eiweiß unfähig macht, den Schwefel zu reduzieren, vielmehr kommen zwei voneinander unabhängige Momente in Betracht, die eiweißfällende und die das Eiweiß chemisch wesentlich — wie bei der Wirkung der Metalloxyde — verändernde Wirkung, welche allerdings im Falle des Sublimats zusammentreffen.

Dementsprechend hebt auch nachträglicher Zusatz von Sublimat zu dem durch Tannin gefällten Eiweiß dessen Wirkung auf den Schwefel auf.

Schließlich sei bemerkt, daß der zu den Versuchen benutzte präzipitierte Schwefel weder SH_2 enthielt, noch, z. B. mit bloßem Gummi arabicum emulgiert, solchen entwickelte.

12. Zur Oxydation von Fettsäuren.

Von **Franz Knoop.**

Friedmann hat in seinen Arbeiten über den Abbau der Aminosäuren [1]) meine Ansichten über den physiologischen Abbau von Fettsäuren [2]) einer Kritik unterzogen, die ich nicht unwidersprochen lassen möchte. Durch seine Erörterungen scheint meine Fragestellung, wie ich sie verfolgt, in mehr als einem Punkte verschoben, und ich möchte deshalb meinen Standpunkt ihnen gegenüber kurz präzisieren.

Meine Frage lautete zunächst: Wie werden normale Fettsäuren im Körper abgebaut? — Um ihr näher zu kommen, glaubt Friedmann, sei die Lösung einer anderen Frage Vorbedingung, nämlich der: Welche chemischen Bedingungen muß eine Fettsäure erfüllen, um im Tierkörper abgebaut zu werden? — Durch solchen indirekten Weg, der auch diejenigen Atomgruppierungen um das angriffsbestimmende Carboxyl festzustellen hat, die den oxydativen Einwirkungen des Organismus Widerstand leisten, bestimmt sich zunächst die Wirkungsbreite, nicht aber der Wirkungsmechanismus tierischer Oxydationsreagentien; und solches Vorgehen kann weit vom Thema abführen und Fragen nahelegen, denen einstweilen eine direkte physiologische Parallele fehlt, wie z. B. die: in welchem Maße sind dimethylierte α-Aminosäuren oxydabel?

Demgegenüber bezog sich meine Arbeit vorerst auf normale, nicht α-substituierte Fettsäuren. Diese werden nun einmal fortwährend in größter Menge im Körper abgebaut, das steht fest. Warum soll nun die Frage nach dem chemischen Reaktionsmechanismus, also nach dem „wie" dieser Oxydation, erst beantwortet werden können, nachdem die andere Frage: Welche Säuren werden sonst noch abgebaut? gelöst worden ist? — Mir scheint, als käme umgekehrt erst nach Feststellung des Reaktionsmechanismus dann als zweites die Frage an die Reihe: Unterliegen auch andere, z. B. α-Oxy- oder α-Aminosäuren dieser Form des Abbaues, oder einer anderen und welcher? — Auf den Abbau dieser Substanzen bezogen sich meine bisherigen Untersuchungen nur nebenbei, als die Möglichkeit einer intermediären Bildung von α-Oxysäuren ins Auge gefaßt werden mußte, die sich aus meinen Befunden ablehnen ließ. Mit der Untersuchung, wie sich nun derartige Substanzen im Tierkörper verhalten, bin ich erst jetzt beschäftigt und zwar auch im Gebiete der phenylsubstituierten Säuren, von denen Phenyl-α-oxybutter-

---

[1]) Diese Beiträge 11, 151.

[2]) Freiburg, Speyer u. Kaerner, 1904.

säure und die von mir dargestellte Phenyl-α-amidobuttersäure mir am meisten Aussicht auf Erfolg zu bieten scheinen. Darüber hoffe ich bald berichten zu können.

Bisher handelte es sich also im wesentlichen um normale Fettsäuren, über deren physiologischen Abbau vor meinen Untersuchungen nichts gesetzmäßiges bekannt war. Durch die Versuche von Schwarz[1]) und anderen war für den Diabetiker der Übergang von Buttersäure in β-Oxybuttersäure nachgewiesen, ob durch direkte Oxydation oder Synthese, blieb unentschieden, und als Schwarz diese Frage diskutierte[1]), erwähnte er bereits, daß eine chemische Analogie für einen derartigen Oxydationsmechanismus fehle, da die Oxydation voraussichtlich in α Stellung angreifen würde[2]). — Nun war es im Gebiete der phenylsubstituierten Fettsäuren, die den Vorzug hatten, bei ihrem physiologischen Abbau einen Rest zu lassen, der Anhaltspunkte für den Oxydationsmechanismus geben konnte, bekannt, daß Phenylpropionsäure und Benzoesäure, die bei der Darmfäulnis aus Eiweiß entstehen, als Benzoesäure (wenn wir von der Paarung mit Glykokoll absehen) ausgeschieden werden. Phenylessigsäure wird dagegen nicht oxydiert, und selbst ihr α-Oxydationsprodukt, die Phenyl-α-oxyessigsäure (Mandelsäure), wird nicht verändert. Diese Substanzen konnten also nicht intermediär aus Phenylpropionsäure entstehen. Dadurch wurde die Frage nahegelegt, einerseits ob wohl ein Angriff auf das α-Kohlenstoffatom überhaupt nicht erfolge, auch nicht intermediär, andererseits ob die Oxydationsprodukte von Fettsäuren auch sonst wie bei der Phenylpropionsäure eine Verminderung um zwei C-Atome aufwiesen. Die Verfütterung von Phenyl-α-oxypropionsäure ergab ein völlig anderes Verhalten als das der Phenylpropionsäure[3]), während Phenyl-β-oxypropionsäure sich etwa wie Phenylpropionsäure verhielt. Die entsprechenden Ketonsäuren verhielten sich ebenso. Dadurch war die erste Frage beantwortet: es schloß sich eine primäre Bildung von α-Oxydationsprodukten aus — sie konnten auch nicht intermediär entstehen und etwa durch Abspaltung und Anlagerung von einem Molekül Wasser über die ungesättigte Zimtsäure in β-Oxypropionsäure übergehen. — Die Entstehung von Oxydationsprodukten, die stets eine gerade, nie eine ungerade Zahl von C-Atomen weniger enthielten, konnte dann durch die Bildung von Phenylessigsäure aus Phenylbuttersäure und von Benzoesäure aus Phenylvaleriansäure erwiesen werden.

Diese Befunde wurden nun in Analogie gestellt:

---

[1]) Verhandl. des Kongr. für innere Medizin 1900.

[2]) Warum Friedmann es ohne nähere Ausführung als „nach chemischer Analogie unwahrscheinlich" bezeichnet, „daß die zuerst einsetzenden Vorgänge, die sich beim physiologischen Abbau der Fettsäuren abspielen, Oxydationsprozesse sind", das entzieht sich meiner Beurteilung. Vielleicht geht er noch einmal auf diese Anschauungen ein.

[3]) Ein spezifisches Verhalten des Organismus gegen diesen dem Eiweißspaltungsprodukt Phenylalanin nahestehenden Körper als Grund dafür anzuführen, hat in diesem Zusammenhange keinen Wert, da dieses spezifische Verhalten dem aus Phenylpropionsäure etwa entstehenden, gleichen Produkt gegenüber wohl in derselben Weise in die Erscheinung treten müßte.

1. mit dem Auftreten von Fettsäuren mit nur gerader C-Atomzahl (18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4) in der Milch, die am einfachsten unter dem Gesichtspunkt der oxydativen Entstehung auseinander durch den analogen Abbau verstanden werden konnte;
2. mit der Bildung von β-Oxybuttersäure aus Buttersäure beim Diabetiker;
3. mit der demgegenüber fehlenden Bildung von „Acetonkörpern“ aus Lävulinsäure, $CH_3-CO-CH_2-CH_2-COOH$.

Die erste Analogie ist direkt einleuchtend. — Die Analogie zu der Bildung von β-Oxybuttersäure war eine Hypothese, die die Vermutung einschloß, daß sich z. B. Phenyl-β-oxybuttersäure aus Phenylbuttersäure bilden würde, bevor Phenylessigsäure daraus entsteht. Diese Analogie wurde deshalb auch keineswegs behauptet, sondern als möglich bezeichnet. Aber auf Grund dieser Analogie wurde die Vermutung der intermediären Bildung von β-Oxysäuren bei der Oxydation der Fettsäuren in der Tat als die einfachste Erklärungsform für diese verschiedenen Beobachtungen ausgesprochen. Und nach diesem Reaktionsmechanismus konnte Lävulinsäure keine „Acetonkörper“ bilden. Nur so ließen sich die angeführten Tatsachen unter einem Gesichtspunkte verstehen, allerdings einem hypothetischen, dem Prinzip der „β-Oxydation“.

Daß dieser Vorstellung die rein chemische Analogie fehlte, ist jedem Chemiker bekannt und war schon von Schwarz besonders betont worden. Aus dem Grunde bezeichnete Friedmann diese Hypothese nicht als eine chemische Erklärung der von mir gefundenen Gesetzmäßigkeiten, wenigstens nicht in dem Sinne einer Zurückführung auf bekannte chemische Analogien — und anderenorts als „zur Deutung dieser Tatsachen entbehrlich“. — Ich habe nun nie behauptet, damit meine Befunde auf bekannte chemische Analogien zurückgeführt zu haben, sondern nur versucht, eine Anzahl physiologisch beobachteter Tatsachen unter diesem einen Gesichtspunkte einheitlich aufzufassen. Mir war im Gegenteil sehr wohl bekannt, daß damit etwas prinzipiell Neues gefunden schien, daß den bekannten Oxydationsreaktionen der organischen Chemiker gegenüber in der Tat etwas ganz Unerwartetes darstellte. Aber der lebende Organismus gestattet sich gewiß noch manche Reaktion, die dem organischen Chemiker noch unbekannt ist. Wenn sich deswegen in Fällen, wie hier, physiologische Analogien zu derartigen Beobachtungen finden lassen, die einen gewissen Grad von Wahrscheinlichkeit für sich haben, so halte ich die vorsichtige Diskussion einer solchen Hypothese nicht nur für erlaubt, sondern sogar für oft recht förderlich oder gar unentbehrlich. Vielleicht hat sie sich auch Dakin, der inzwischen tatsächlich β-Oxydationsprodukte, nämlich Phenyl-β-oxypropionsäure, als Oxydationsprodukt der Phenylpropionsäure aufgefunden hat, nützlich erwiesen.

Friedmann will dann „β-Oxydation“ durch „paarigen Abbau“ ersetzt wissen und will mit diesem Ausdruck offenbar alles Hypothetische meiden. Damit geschieht indessen streng genommen dasselbe, was er hier ablehnt. Der paarige Abbau, unter dem doch wohl die

paarweise Absprengung von immer zwei C-Atomen zu verstehen sein wird, bleibt z. B. für die Phenylvaleriansäure so lange Hypothese, als wir nicht Verbindungen mit ausschließlich 9 C-Atomen als die einzigen Zwischenprodukte bei dem Abbau dieser Säure zu Benzoesäure kennen, also nachgewiesen ist, daß die C-Atome tatsächlich immer nur paarweise abgesprengt werden. Und auch diese Hypothese stellt, selbst vor Dakins Publikation, keine „chemische Erklärung im Sinne einer Zurückführung auf bekannte chemische Analogien" dar, da wir für solchen paarigen Abbau keine chemische Reaktion kennen, bei der durch Oxydation von Fettsäuren stets nur solche mit $n \times 2$ C-Atomen weniger gebildet werden. Jetzt aber ist diese Bezeichnung sogar ganz bedenklich geworden, wenn Dakin[1]) nachgewiesen hat, daß in vitro fettsaure Ammonsalze mit H_2O_2 zwar β-Oxydation zeigen, aber unter Absprengung nur eines C-Atomes als CO_2 zunächst in die β-Ketone übergehen; und wer also in dieser H_2O_2-Oxydation die rein chemische Analogie sehen will, muß jetzt wohl das Wort „β-Oxydation" als das vorsichtigere anerkennen und den „paarigen Abbau" wieder streichen. Der Befund von Acetophenon als Abbauprodukt der Phenylpropionsäure zwingt ihn dazu — immer vorbehaltlich der richtigen Deutung der Dakinschen Befunde durch ihren Autor, dessen ausführliche Publikation noch nicht vorliegt.

Im übrigen hat es unseres Erachtens keinen Zweck, über die Entbehrlichkeit von Hypothesen zu diskutieren und eine durch die andere zu ersetzen, solange man sie nicht durch neue Tatsachen stützen oder erschüttern kann. Und solche liegen vorderhand nicht vor.

Bestätigen sich dagegen Dakins Befunde, so scheinen durch sie die von mir entwickelten Vorstellungen ihren Beweis gefunden zu haben,

[1]) Americ. Journ. f. biolog. Chem. 4, 77 (Jan. 1908).

Freiburg i. B., Mai 1908.

Beiträge zur Chemischen Physiologie und Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

XI. Band 11. und 12. Heft

(Ausgegeben Juni 1908)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1908

Inhalt des 11. und 12. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

XXXIII.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide.

(Siebente Mitteilung.)

Salzionenverbindungen mit amphoterem Eiweiß.

Von **Wolfgang Pauli** und stud. med. **Hans Handovsky.**

(Aus der biologischen Versuchsanstalt in Wien, physikal.-chem. Abteilung.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.)

Im Verlaufe unserer kolloidchemischen Untersuchungen am Eiweiß hat sich eine allmähliche Verschiebung ihrer Richtung ergeben. Ursprünglich an natürlichen tierischen Flüssigkeiten, wie Eierklar oder Serum vorgenommen, waren sie zugleich bestimmt, in relativ kurzer Zeit ein reiches Material für den auch als heuristisches Prinzip angewendeten Satz vom Parallelismus kolloidaler und funktioneller Änderungen in der lebendigen Substanz beizubringen. Die große Mannigfaltigkeit in den Beziehungen der Elektrolyte zu den Eiweißstoffen, welche sich bei diesen Versuchen offenbarte, mußte dazu führen, auch im Organismus eine im physikalisch-chemischen Sinne viel komplexere Verbindung der Eiweißkörper mit den Elektrolyten anzunehmen, als zumeist vorausgesetzt wird.

Um einen tieferen Einblick in diese Verhältnisse zu erreichen, erschien nun jener Weg am aussichtsvollsten, der, von einer in physikalisch-chemischer Hinsicht einfachen Eiweißlösung ausgehend, zu willkürlich veränderten komplexen Formen derselben fortschreitet. In einer früheren Mitteilung war berichtet worden, daß es mittels einer weit getriebenen Dialyse gelingt, Eiweiß als stabiles, (praktisch) elektrisch neutrales Sol zu erhalten. Ein solches Eiweiß besteht fast nur aus elektrisch neutralen Teilchen und stellt also eine in physikalisch-chemischer Hinsicht einheitliche kolloidale Flüssig-

keit dar. Wir wollen es der Kürze halber als amphoteres Eiweiß bezeichnen im Gegensatze zu dem einsinnig geladenen Alkali- oder Säureeiweiß, welches zudem infolge von Ionisation und hydrolytischer Dissoziation verschiedenartige Moleküle und Ionen enthält und daher ein viel komplexeres Verhalten seiner Zustandsänderungen darbietet. Die vorliegenden Versuche beschäftigen sich mit den Beziehungen der Salze zum amphoteren Eiweiß, wobei in erster Linie auf die Erscheinungen bei niederem Salzgehalte Rücksicht genommen ist, die für die Beurteilung der physiologischen Verhältnisse von besonderer Wichtigkeit sind.

I.

Man muß es als ein wichtiges Postulat aufstellen, daß Versuche, welche die physikalisch-chemischen Veränderungen von Eiweiß unter dem Einflusse gleichzeitig anwesender Kristalloide aufklären wollen, methodisch auf einer für das Eiweiß charakteristischen oder demselben in besonders starkem Maße zukommenden Eigenschaft aufgebaut sein sollen. Versuchsverfahren, welche etwa zum Nachweise von Beziehungen der Eiweißkörper zu Elektrolyten auf die Veränderungen der Eigenschaften der letzteren gegründet sind, werden selten genügende, in der Regel negative Ergebnisse liefern. Dies ergibt sich daraus, daß zu Veränderungen des hochmolekularen Eiweißes in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften sehr geringe absolute Mengen der Elektrolyte ausreichen könnten, deren Wegfall mit den meisten Methoden nicht merkliche Änderungen in der Lösung hervorruft. In der Tat haben negative Versuche mit Hilfe der Leitfähigkeitsbestimmung oder der Gefrierpunktsbestimmung oder mit anderen zurzeit nicht genügend genauen Methoden zu der Anschauung geführt, daß die Salze mit den Eiweißkörpern in einer Lösung nicht in engere Verbindung treten. Für eine gegenteilige Anschauung haben wohl verschiedene Wahrnehmungen gesprochen, aber bisher die zwingenden Beweisstücke gefehlt.

Wir wählten zunächst als Verfahren zum Nachweise solcher Salzeiweißbeziehungen die Hitzekoagulation von amphoterem Eiweiß, welche — wie sich herausstellte — durch Elektrolyte in charakteristischer Weise abgeändert wird.

Die Versuchmethodik für die Feststellung der Koagulationstemperatur war im Prinzip die gleiche wie in früheren Arbeiten[1]),

---

[1]) W. Pauli, Pflügers Arch. 78, 315, diese Beiträge 10, 53; vgl. auch Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 182.

sie mußte nur durch einige Abänderungen für die Zwecke der vorliegenden Untersuchung verfeinert werden. Von den zwei Momenten der Hitzegerinnung, der eben eintretenden Trübung (I) und jenem Grade der Undurchsichtigkeit (II), der durch das Verschwinden einer und derselben Druckprobe charakterisiert ist, gestattet nur der zweite eine weitergehenden Ansprüchen auf Schärfe und Reproduzierbarkeit genügende Fixierung. Die Bestimmung der Temperaturbreite zwischen Punkt I und II hat dennoch ein gewisses Interesse für die Beurteilung der Geschwindigkeit des Wachstums der Koagula. Diese kann verschieden von der Koagulationstemperatur variieren. Ein Salz, das beispielsweise die Hitzegerinnbarkeit, kenntlich an der Erhöhung der Koagulationstemperatur, hemmt, kann gleichzeitig das Wachstum der ausgeflockten Teilchen vom Momente der bläulichen Opalescenz bis zu dem der opaken Trübung beschleunigen und sehr scharfe Umschläge und damit sehr sichere Ablesungen der Koagulationstemperatur gestatten, wie dies z. B. beim Natriumsulfat schon in dünnen Konzentrationen sehr auffällig der Fall ist. Auch in bezug auf die Zahl, die Größe und die Art des Wachstums der „Koagulationskerne" bestehen Verschiedenheiten, die, wiewohl einer quantitativen Messung schwer zugänglich, für das Bestehen qualitativer Unterschiede des Vorganges in geeigneten Fällen verwertbar sind. In dem einen Fall geht die Trübung aus einem Stadium bläulicher Opalescenz nur allmählich in ein solches einer makroskopisch sichtbaren Ausflockung über; hier bleibt die Lösung relativ lange durchsichtig. Das ist die Regel bei niederem Salzgehalt. Bei sehr hohem Salzgehalt ist meist schon die erste Trübung grau und bald so dicht, daß sie völlig undurchsichtig wird; hier erfolgt die Bildung großer Flocken spät. Die Koagulationskerne sind in diesem Falle zahlreich und wachsen lange jeder für sich ohne starke Tendenz zur Vereinigung in größeren Aggregaten.

Alle diese Verschiedenheiten im Ablauf der Hitzegerinnung bilden ein Hemmnis für die Gewinnung von befriedigenden Beobachtungswerten. Allein die wichtigste Fehlerquelle ist der ungleiche Anstieg der Erwärmung, welcher unter sonst gleichen Umständen zu Koagulationspunkten führt, die selbst um einige Grade auseinanderliegen. Hier mußten gleichförmige Versuchsbedingungen geschaffen werden, wobei sich folgendes einfache Mittel am besten bewährte. Mit Hilfe einer vorläufigen Bestimmung wurde die Koagulationstemperatur einer Probe der zu untersuchenden Eiweißmischung festgestellt; hierauf wurde das Bad, in das die Eprouvette

mit der Eiweißprobe taucht, auf 1 bis 2 Grade über die Koagulationstemperatur gebracht und auf dieser Höhe mit Hilfe einer kleinen Flamme konstant erhalten. So konnte die thermische Vorgeschichte der zu prüfenden Eiweißlösung genügend gleichmäßig gemacht werden. Eine Reihe von Bestimmungen, in der gleichen Art ausgeführt, ergab Schwankungen, die meist über 0,2 bis 0,4 Grade nicht hinausgingen. Aus einer größeren Anzahl so gewonnener Werte wurde das Mittel genommen. Eine künstliche Lichtquelle, die vor dem Beobachter stand und gegen denselben durch einen Schirm verdeckt war, so daß das Licht nicht in dessen Augen, sondern nur schräge von vorn durch die Eiweißlösung fiel, genügte für die Herstellung gleichförmiger optischer Versuchsbedingungen. Das Eiweiß war stets ein durch mindestens sechs Wochen ohne Kohlensäurezutritt gegen ständig gewechseltes destilliertes Wasser dialysiertes Rinderserum, das durch Toluol vor Fäulnis geschützt war. Am Schlusse wurde es filtriert, zur Klärung von feinsten Globulintrübungen ruhig durch 3 bis 5 Monate stehen gelassen, hierauf abermals filtriert. Es war völlig klar, koagulierte sehr vollkommen durch Hitze und Alkohol und leitete den elektrischen Strom nicht merklich besser als unser destilliertes Wasser. Sämtliche Salzlösungen wurden aus analysenreinen Handelspräparaten hergestellt, bis 0,1 n durch Verdünnung aus Normallösungen, alle höheren Konzentrationen wurden, wo nichts anderes vermerkt ist, durch Wägung der Salze und Zusatz zu dem entsprechenden Volumen, meist 100 cm^3, Wasser oder gleicher Teile von Wasser und Eiweiß bereitet. Es mußte von der Anwendung von Normallösungen im gebräuchlichen chemischen Sinne Abstand genommen werden, weil bei diesen ein Teil des Wassers durch Salz ersetzt ist und so mit wachsendem Salzgehalte immer weniger Wasser auf die gleiche Eiweißmenge gekommen wäre. Eine steigende Eiweißkonzentration erhöht aber den Koagulationspunkt beträchtlich, wodurch die Einwirkung der zugesetzten Substanz hätte verdeckt werden können.

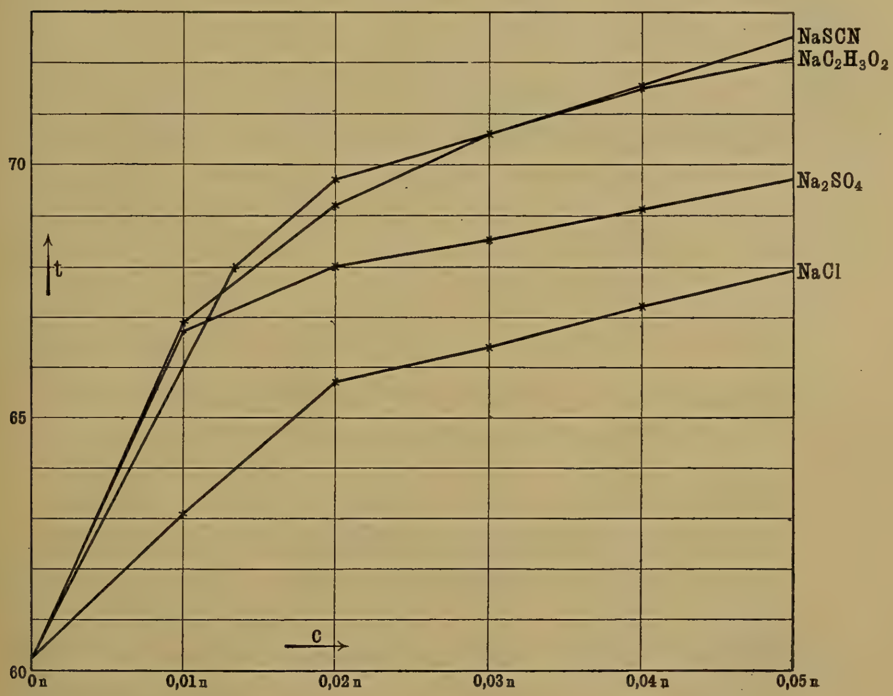
Es sind also sämtliche Versuche bei konstantem Eiweißgehalt ausgeführt, soweit nicht die Stammlösung des verwendeten Eiweißes verschieden war. Es standen drei gereinigte Eiweißlösungen zur Verfügung, deren spezifische Gewichte in halbverdünntem Zustande 1,0042 (A), 1,0030 (B) und 1,00284 (C) betrugen. Der entsprechende Eiweißgehalt aus der Stickstoffbestimmung, nach Kjeldahl berechnet, ergab für die unverdünnten Lösungen A: 3,29 Proz.; B: 2,355 Proz.; C: 2,23 Proz. Die zugehörigen Koagulationspunkte waren 60,3, 64,7 und 64,6 Celsiusgrade.

Die Untersuchung ergab, daß die Salze schon in sehr niedrigen Konzentrationen den Koagulationspunkt beeinflussen und zwar ausnahmslos erhöhen[1]). Darüber belehrt die folgende, mit ganz besonderer Sorgfalt aus zahlreichen Bestimmungen gewonnene Tabelle.

Tabelle I.

Salz	0,00 n	0,01 n	0,02 n	0,03 n	0,04 n	0,05 n
NaSCN . . .	60,3	67,9—68	69,7	70,6	71,6	72,5
Na_2SO_4 . . .	60,3	66,7	68	68,5	69,1	69,7
NaCl	60,3	63,16	65,7	66,4	67,2	67,9
$NaC_2H_3O_2$ . .	60,3	66,9	69,2	70,6	71,5	72,1
KSCN	64,6	68,3	—	69,5	—	70,3

Fig. 1.



[1]) Die regelmäßige Erhöhung der Koagulationstemperatur durch Neutralsalze in niederen und mittleren Konzentrationen wurde zum ersten Male von Pauli (1899) am nativen Hühnereiweiß beobachtet und systematisch untersucht (Pflügers Arch. 78, 315). Starke hat dann (1901) die gleiche

Wie aus der Tabelle und noch besser aus der zugehörigen Fig. 1 hervorgeht, ist die durch die Salze bedingte Erhöhung des Koagulationspunktes bei niedrigen Konzentrationen relativ bedeutender als bei hohen, worauf noch im Zusammenhang zurückgekommen wird. Gegenüber dem einheitlichen Charakter der Koagulations-

Tabelle II[1]).
Chloride — Eiweiß B (64,7°).

Kation	0,05 n	0,1 n	0,5 n	1 n	2 n	3 n
Li . . .	69,0—69,4	71	72,8	73,8—73,7	72,8—72,7	71,2—71,4
K	68,8	70,5	73,0—73,2	73,5	74,8	75,6
Na . .	70,2	70,8—70,7	73,2	73,4	74,6—74,8	73,6
NH_4 . .	68	69,2	70,8	71,4	71,4	71,6
Ca . . .	68	70,4	71,2—71,4	69,8	68,2—68,4	66,0
Ba . . .	68,4	70,2	72,2	70,4—70,6	69,4	67,2—67,4
Sr . . .	69	70,8	72	71	71	69,2—69,5
Mg . .	68,0—68,2	69,4—69,6	72,6—72,8	72,8	73,8	75,4

Tabelle III[2]).
Kalisalze — Eiweiß B (64,7°).

Anion	0,05 n	0,1 n	0,5 n	1 n	2 n	3 n
Cl	68,8	70,5	73,0—73,2	73,5	74,8	75,6
Br	69,8	71,4—71,6	73,6	73,6	74,2	73,4
NO_3	70,8	71,3	73,8	73,6	72,8—73,0	72,8—73,0
SCN . . .	71,8	71,5	73,8	θ	θ	θ
J	—	70,6	73,4	74	θ	θ
$C_2H_3O_2$ . .	73,8	75	74,6—74,8	73,8	73,8—74,0	73,8—74,0
SO_4	70	71	73	74,6	74,6—74,8	74,6—74,8
C_2O_4 . . .	72	73,4—73,6	73,4	72,6	69	+
$C_6H_5O_7$ . .	77,2	75,4	73,8	72,6	70	+
F	—	73,5	75,7	73	+	—

Neutralsalzwirkung an einer durch mehrtägige Dialyse bei 54° C gewonnenen Albuminlösung gefunden. Seine Mitteilungen sind nur mit wenigen Versuchsdaten belegt. Die angewandte Konzentration der Salze bewegte sich um 1 n und betrug nur in einem Falle 0,2 n $MgSO_4$ (Zeitschr. f. Biologie **42**, 223—226). Bei dieser Gelegenheit hat Starke als erster die wertvolle Feststellung gemacht, daß Glykose in viel geringerem Maße die Konzentration hemmt als Neutralsalze. (Zwei Versuche 0,3 n und 1,15 n.) Daran knüpft er einen kurzen Hinweis auf die relative Bedeutung der elektrolytischen Dissoziation für das Zustandekommen der Koagulationshemmung. Von einer theoretischen Verwertung seiner Befunde sieht Starke ab. Dazu reicht auch das geringe Tatsachenmaterial nicht aus.

[1]) Siehe vorstehende Anmerkung.

[2]) Das Zeichen θ bedeutet, daß beim Kochen keine Hitzekoagulation erfolgt, + bedeutet Fällung bei Zimmertemperatur, — nicht untersucht.

hemmung bei niederem Salzgehalt, kommt es bei höherem zu einer großen Mannigfaltigkeit der Koagulationsbeeinflussung. Darüber belehren die Tabellen II und III, aus denen auch der Einfluß der Kationen und Anionen auf die Hitzegerinnung von amphoterem Eiweiß ersichtlich ist.

Nach diesen Versuchen haben sowohl die Kationen als auch die Anionen Einfluß auf die Hitzegerinnung. Bezüglich der Kationen gilt folgendes (vgl. Fig. 2). Die Chloride von K, Na, NH_4 und Mg geben Kurven von ähnlichem Verlauf, welche anfangs rasch, dann langsam ansteigen, hingegen zeigen Ca, Sr und Ba einen von diesem Verhalten verschiedenen, innerhalb dieser Gruppe aber ähnlichen Einfluß auf die Hitzekoagulation. Die Kurven für die Erdalkalien ergeben bei 0,5 n ein Maximum der Koagulationstemperatur und dann stetigen Abfall derselben. Die Kurve für LiCl liegt zwischen diesen zwei Gruppen, indem sie erst bei 1 n ein Maximum und dann den Abfall des Koagulationspunktes anzeigt.

Die Rolle der Anionen ist eine stark variante (vgl. Fig. 3). SO_4, Cl, Br und NO_3 bilden eine Gruppe, deren Kurven der Gerinnungstemperatur einen recht ähnlichen Gang aufweisen. Erst rascher Anstieg bis 0,5 bis 1 n, dann nur sehr geringe Schwankungen der Koagulationspunkte im Bereiche von 1 bis 3 n Salzgehalt. Diesen Kurven schließen sich allerdings nur bis zur Konzentration 0,5 bzw. 1 n die Salze des SCN und J an, welche oberhalb dieser Konzentration eine rasch zunehmende Hemmung der Hitzekoagulation bewirken. Von 1 n bzw. 2 n an wird diese Hemmung eine vollständige und bleibt es bis zu dem höchsten erreichbaren Salzgehalt.

Von diesem eigenartigen Verhalten, welches charakteristischerweise erst bei höheren Konzentrationen eintritt, während sich bei niederen keine Anomalie zeigt, weicht die folgende Salzgruppe sehr erheblich ab. Zu ihr gehören das Citrat, Acetat und Oxalat, bei denen es in den Konzentrationen 0,05 bis 0,1 n zu einem jähen Anstieg der Koagulationstemperatur kommt, worauf die Kurve mehr oder minder abschüssig verläuft. Am stärksten ist dies beim Citrat ausgesprochen. In allen diesen Fällen handelt es sich um die stark hydrolytisch dissoziierenden Salze schwach organischer Säuren mit starkem Alkali, wobei es offenbar in den niederen Konzentrationen mit stärkster Hydrolyse mehr oder minder zu Bildung von Alkalieiweiß kommt, das nicht hitzekoagulabel ist. Je nach dem Grade dieser Bildung wird der Gehalt an übrigbleibendem hitzekoagulablen Eiweiß variieren. Über das Verhalten

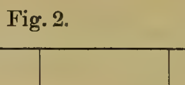


Fig. 2.

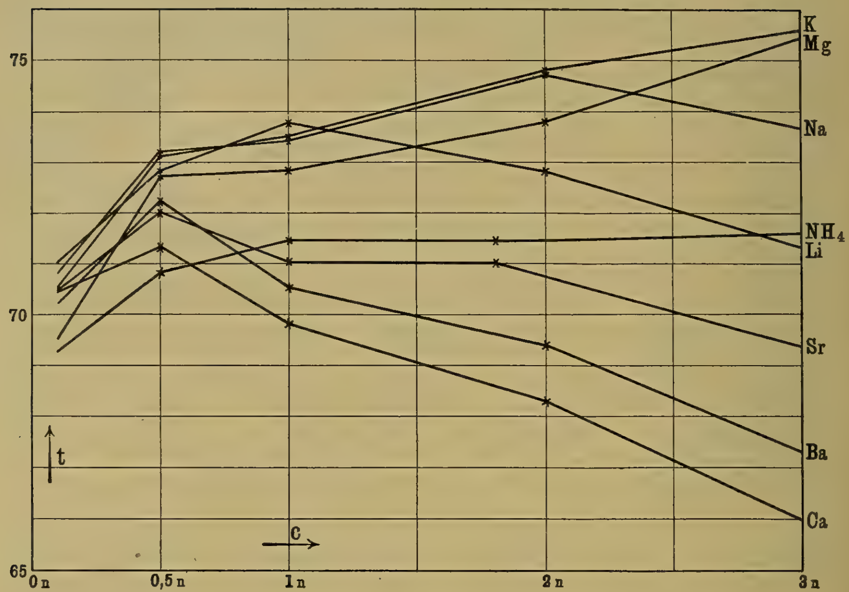
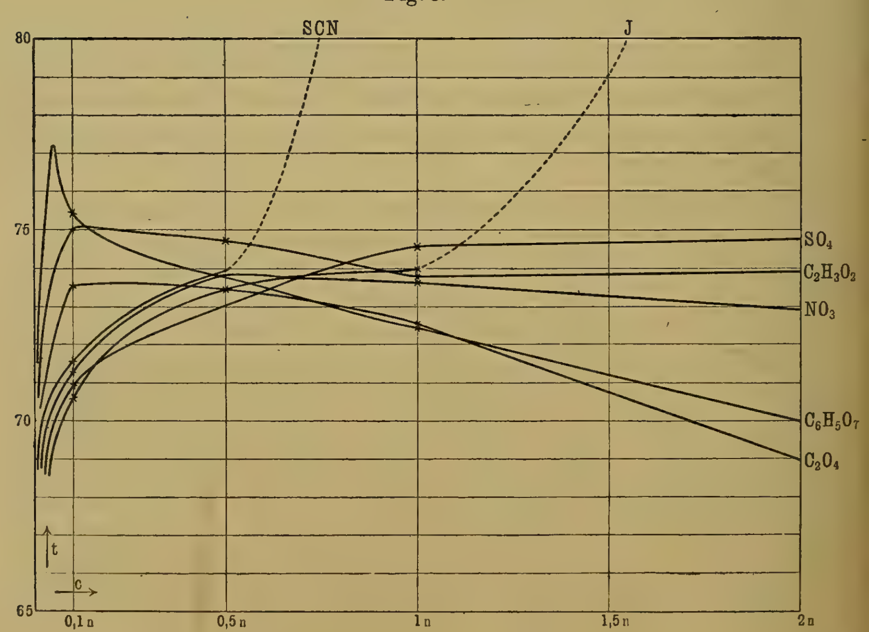

75
70
65
t
c
0 n
0,5 n
1 n
2 n
3 n
K
Mg
Na
NH4
Li
Sr
Ba
Ca

Fig. 3.


SCN
J
80
75
70
65
t
c
0,1 n
0,5 n
1 n
1,5 n
2 n
SO4
C2H3O2
NO3
C6H5O7
C2O4

hydrolytisch stark dissoziierender Salze wird in einem besonderen Abschnitte berichtet werden.

Steigert man die Konzentrationen der Salze über 3 n, dann können sich die Verhältnisse der Hitzegerinnung weiter ändern. Am auffallendsten zeigen sich hier die Mg-Salze und zwar Chlorid und Nitrat, welche von einer Konzentration von 6 n und 4 n ab die Hitzegerinnung vollständig hemmen (vgl. Tabelle V).

Andere Salze wie NH_4Cl und NH_4NO_3, deren hohe Löslichkeit eine Verfolgung ihres Einflusses auf die Hitzekoagulation bis zu einem bedeutenden Salzgehalt gestattet, zeigen schließlich ein geringes Absinken der Koagulationstemperatur (vgl. Tabelle IV).

Im allgemeinen ist das Absinken der Koagulationstemperatur nach Überschreitung eines Maximums bei denjenigen Salzen am deutlichsten ausgeprägt, welche in der Kälte in höheren Konzentrationen das amphotere Eiweiß ausfällen. Selbst wenn man von dem stark eiweißfällenden Citrat und Oxalat wegen der Komplikation durch die Hydrolyse absieht, so bleibt diese Maximumbildung mit darauf folgendem jäheren Abfall auch noch für das stark fällende Fluorid und die Sulfate sehr charakteristisch (vgl. auch Tabelle IV und V). Das $MgSO_4$ schließt sich dabei den anderen Sulfaten an.

Tabelle IV.

Eiweiß B.

Salz	1 n	2 n	3 n	4 n	5 n	6 n	9 n
NH_4Cl . .	71,4	71,4	71,6	72,8	72,4	72,8	69,4
NH_4NO_3 .	69	68,9	68,6	—	—	67,6	66
$(NH_4)_2SO_4$.	73,5	74,3	68	+	—	—	—

Tabelle V.

Eiweiß B.

Salz	0,5 n	1 n	2 n	3 n	4 n	5 n	6 n	9 n
$MgCl_2$ . . .	72,6—72,8	72,8	73,8	75,4	82	84,8	98 unvollständig	θ
$Mg(NO_3)_2$.	69,5	69,2	81	—	θ	θ	θ	θ
$MgSO_4$ . .	73,6	75,2	75,6	72,2	+	—	—	—

Diese Versuchsergebnisse lassen die völlige Verschiedenheit in dem Verhalten von amphoterem und elektrisch geladenem Eiweiß (Alkali- oder Säureeiweiß) in geeigneten Konzentrationen bei

der Hitzekoagulation zutage treten. In letzterem Falle[1]) bewirken Salze stets den Eintritt und eine zunehmende Förderung der Gerinnung, im ersteren stets eine bis zu einem gewissen Grade mit der Konzentration wachsende Koagulationshemmung, die erst bei hohem Salzgehalte einer Änderung der Koagulationsbeeinflussung Platz macht. Die Hitzegerinnung kann dann völlig aufgehoben werden, wie bei den Rhodaniden und Jodiden, oder es kann wieder mit wachsender Salzkonzentration eine zunehmende Koagulierbarkeit eintreten, wie bei Fluorid, Sulfat, Citrat, Oxalat, Acetat. Dieselbe Erscheinung findet sich nur in sehr abgeschwächtem Grade und bei hohen Konzentrationen, bei Chloriden und Nitraten. Nicht nur mit dem verwendeten Anion, sondern auch mit dem Kation hängt die Abänderung des Ganges der Hitzekoagulation zusammen. In hohen Konzentrationen bewirken Mg-Salze (das Sulfat ausgenommen) eine völlige Aufhebung der Hitzegerinnbarkeit, während bei dem gleichen Anion Li und namentlich die Salze der Erdalkalien eine zunehmende Steigerung der Koagulierfähigkeit, kenntlich an dem Absinken der Gerinnungstemperatur, zur Folge haben.

II.

Nach dem Vorangegangenen wird es sich empfehlen, bei der theoretischen Behandlung der Versuchsergebnisse die Erscheinungen bei niederem Salzgehalt von denen bei hohem zu trennen. Die ersteren sind völlig einheitlich, wenn man von den als besondere Fälle leicht erkennbaren Anomalien der hydrolytisch stark gespaltenen Salze absieht. Hingegen sind die Verhältnisse bei hohem Salzgehalt überaus mannigfaltig und weisen durch ihre Beziehungen zu den Neutralsalzfällungen von Eiweiß auf eine sekundäre Beeinflussung des Gerinnungsvorganges hin.

Eine Hemmung der Hitzegerinnung, kenntlich an der Erhöhung der Koagulationstemperatur, wie sie sämtlichen Salzen in niederer Konzentration eigentümlich ist, wird im allgemeinen auf zweifache Weise möglich sein, wenn man von einer direkten Verminderung des hitzekoagulabeln Anteiles der Eiweißlösung, also einer Verdünnung, absieht. Es kann sich entweder um eine Hemmung jener chemisch irreversiblen, in ihrem Wesen noch dunkeln Veränderung[2])

[1]) Vgl. diese Beitr. 10, 53.

[2]) Starke vermutet im Anschlusse an Michailow, daß es sich bei der Hitzekoagulation um den Verlust von Wasser aus dem Eiweißmolekül handelt, welches nach Art des Kristallwassers darin gebunden ist (Zeitschr. f. Biologie 42, 206). Siehe auch L. Moll, diese Beitr. 4, 563.

des gelösten Eiweißes in der Hitze handeln oder um eine Behinderung des Zusammentrittes der durch die Hitze veränderten kleinsten Eiweißteilchen zu größeren, schließlich als Trübung und Flocken erkennbaren Aggregaten. Für die Annahme einer Verhinderung der chemischen Hitzeveränderung findet sich in analogen Fällen kein Beispiel. Selbst dort, wo die Hemmung der sichtbaren Hitzekoagulation eine vollständige ist, wie bei Alkali- und Säureeiweiß, läßt sich zeigen, daß das Erhitzen mit einer dauernden chemischen Veränderung, einer Denaturierung, verbunden ist. Es braucht nur auf die gegenüber den nativen Eiweißstoffen vollständig geänderten Fällungsverhältnisse solcher denaturierter Proteïne durch Neutralsalze verwiesen zu werden. Auch für die oben beschriebene Unterdrückung der Hitzegerinnung durch Rhodanid und Jodid hat sich zeigen lassen, daß es sich nur um die Hemmung der sichtbaren Ausflockung, nicht der Denaturierung handelt.

Versuch: Eine Eiweißsalzmischung, welche 2n KSCN enthält, wird einige Minuten aufgekocht und in zwei Proben geteilt; die eine unter Toluol bei Zimmertemperatur stehen gelassen, die andere geschlossen gegen häufig gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert. Während die Kontrollprobe klar bleibt, zeigt die dialysierte eine mächtige grobflockige Fällung, die sich von völlig wasserklarer, eiweißarmer Flüssigkeit absetzt. Der Versuch gelingt in gleicher Weise mit KJ oder den entsprechenden Natriumsalzen.

Gekochtes und abgekühltes amphoteres Eiweiß wird bei Zimmertemperatur durch Zusatz von Rhodanid nicht wieder gelöst, wohl aber fast vollständig aufgehellt durch neuerliches Aufkochen mit dem Rhodansalz.

Daraus geht hervor, daß auch die Salzhemmung der Hitzekoagulation nur zu einem Ausbleiben des sichtbaren Zusammenflockens nicht aber der Denaturierung führt.

Faßt man nun für die als Erhöhung der Koagulationstemperatur sich äußernde Störung der Hitzegerinnung durch schwache Salzlösungen gleichfalls die Möglichkeit einer Behinderung der Flockenbildung ins Auge, so liegt es am nächsten, an eine durch das Salz bedingte Veränderung der Oberfläche der Eiweißteilchen zu denken. Dieselbe könnte in einer Adsorption des Salzes und zwar der Ionen bestehen, da es sich um sehr verdünnte Lösungen handelt. Die Annahme einer engeren Verbindung des Eiweißes mit den Salzionen ist schon vor längerer Zeit von dem einen von uns (Pauli[1]) anläßlich des Studiums der Löslichkeitsbedingungen des

---

[1]) l. c., Pflügers Arch. 78, 315. Anzeiger d. Kais. Akademie d. Wissensch., 12. Okt. 1899.

Globulins und fast gleichzeitig und unabhängig von J. Loeb[1]) auf Grund seiner bekannten Studien über physiologische Ionenwirkungen aufgestellt worden[2]). Seither hat sich im Anschlusse an die grundlegenden Versuche von van Bemmelen[3]) durch eine Reihe von Arbeiten, insbesondere durch die überaus aufklärenden Untersuchungen von H. Freundlich[4]), die Lehre von den Adsorptionserscheinungen stetig fortentwickelt. Von Bayliss[5]) wurde für die Bindung der Salze in Gelatine auf Grund von fortlaufenden Leitfähigkeitsbestimmungen ausgewaschener Gelatine und von Wolfgang Ostwald[6]) anläßlich der Beobachtung der Leimquellung in sehr verdünnten Salzlösungen die Vermutung ausgesprochen, daß es sich beim Leim um Ionenbindung durch Adsorption handelt. Wolfgang Ostwald[7]) hat auch den Versuch gemacht, die in unserer letzten Mitteilung über Hitzekoagulation von Säureeiweiß enthaltenen Tabellen, welche den Einfluß der Salze auf diesen Vorgang betreffen, unter der Annahme zu berechnen, daß die Kurven dem Adsorptionsgesetze folgen und in einigen Fällen gute Übereinstimmung erhalten. Noch bessere Harmonie zwischen Beobachtung und Berechnung ergab die gleiche Verarbeitung von Versuchen Bonmartinis[8]) durch Wolfgang Ostwald[7]), welche die Herabdrückung des Koagulationspunktes eines nativen Muskeleiweißes durch zugesetzte Salze betreffen. Wolfgang Ostwald äußert sich über die Frage nach dem Zusammenhange einer Änderung der Gerinnungstemperatur mit einem Adsorptionsvorgange in seinem Falle mit Recht sehr zurückhaltend. Denn die von ihm herangezogenen Versuche betreffen zweifellos die komplizierten Verhältnisse von Säure- und einem nativen Alkalieiweiß, deren Hitzegerinnung durch Salzzusatz befördert wird[9]). In unserem Falle handelt es sich um ein im physikalisch-chemischen Sinne einheit-

---

[1]) Amer. Journ. of physiol. III, 327, vgl. Dynamik der Lebenserscheinungen, Leipzig 1906; das. Literatur.

[2]) Auch in den Untersuchungen von T. B. Robertson (Journ. of biol. Chem. 1, 279, 507) hat sich die Annahme von Ioneneiweißverbindungen für die Deutung des Einflusses von Elektrolyten auf die Gewebsfärbung, sowie auf die Giftigkeit der Alkaloide förderlich erwiesen.

[3]) Literatur s. Müller, Allg. Chemie d. Kolloide. Leipzig 1907, S. 111.

[4]) Zeitschr. f. physik. Chemie 57, 385. Zeitschr. f. Chemie u. Industrie der Kolloide II, 65 (1907).

[5]) Biochemical Journal 1, 175 (1906).

[6]) Pflügers Arch. 111, 581 (1906).

[7]) Zeitschr. f. Chemie u. Industrie d. Kolloide II, 108 u. 138 (1907).

[8]) Siehe Wo. Ostwald, l. c.

[9]) Die Erörterung dieser Erscheinung folgt in der nächsten Mitteilung.

liches Eiweiß, dessen Gerinnbarkeit in der Hitze durch zugesetzte Salze gehemmt wird. Hier ist eine einzige Molekülart, nämlich elektrisch neutrale, vorhanden und eine uniforme Beeinflussung derselben durch den Salzzusatz vorauszusetzen.

Nimmt man an, daß die Erhöhung des Koagulationspunktes der durch Adsorption gebundenen Salzmenge proportional ist, so wird für dieselbe die Gleichung gelten $t - t_0 = Kc^m$, wo K und m Konstante, c die Salzkonzentration und t bzw. t^0 die Koagulationstemperatur von Salzeiweiß und reinem Eiweiß gleichen Eiweißgehaltes sind. Allerdings ist hier die Salzkonzentration c aus der zugesetzten Salzmenge und nicht nach Abzug des adsorbierten Anteiles berechnet, während die Adsorptionsgleichung streng genommen nur für die miteinander im Gleichgewichte stehenden Konzentrationen zutrifft. Infolge der geringen absoluten Salzmengen, die adsorbiert werden, zeigt sich der aus dieser Substitution erwachsende Fehler nicht störend genug, um die vorhandenen Beziehungen zu verdecken. Die obige Gleichung wurde nach Wilhelm Ostwald[1]) geprüft, indem die Kurve für die Logarithmen von $t - t^0$ und c konstruiert wurde. Sie muß eine Grade sein, falls das Exponentialgesetz zutrifft. Die folgende Fig. 4, welche als Ordinate die $log(t - t_0)$ und als Abszisse die $log\, c$ enthält, zeigt die weitgehende Geltung der obigen Formel.

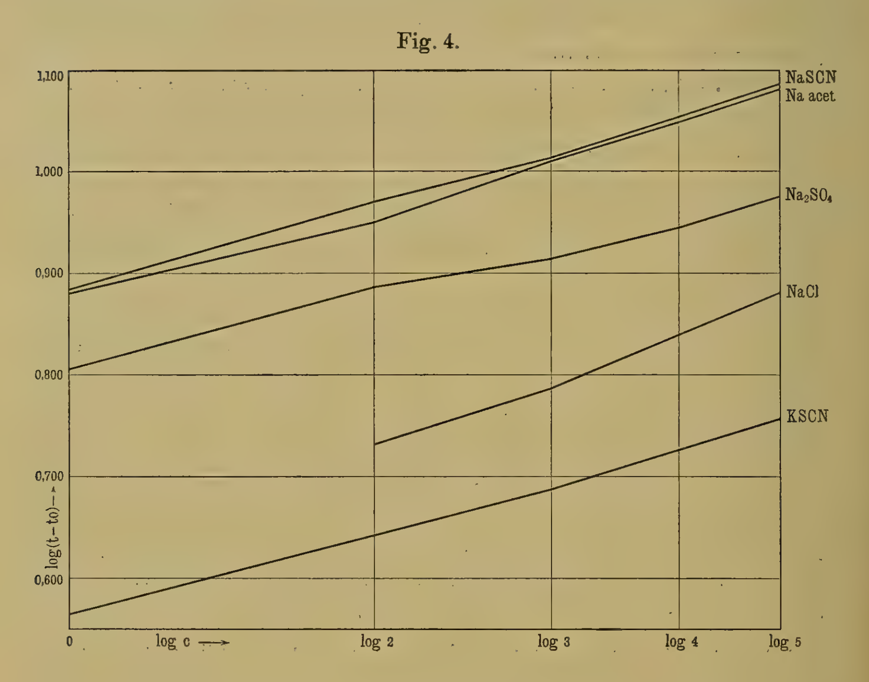
Aus dieser graphischen Darstellung folgt, daß, abgesehen von einem einzigen herausfallenden Werte von NaCl (0,01 n), das Exponentialgesetz für NaCl, NaSCN, Na_2SO_4, KSCN, $NaC_2H_3O_2$ gilt. Bei $NaC_2H_3O_2$ ist die Kurve der logarithmischen Werte von $t - t_0$ und c sehr schwach gekrümmt, entsprechend relativ zu großen Werten von t bei den Anfangskonzentrationen, eine Abweichung, die durch die merkliche Hydrolyse dieses Salzes ihre Erklärung finden könnte.

Es ist leicht ersichtlich, daß die Werte, die man für die Konstanten der Adsorptionsgleichung K und m erhält, in unserem Falle nicht jene Bedeutung haben können, wie in jenen Bestimmungen[2]), denen die Konzentration des adsorbierten Salzes und die Gleichgewichtskonzentration der äußeren Lösung zugrunde liegt. Bei diesen werden auf Abszisse und Ordinate die gleichen Einheiten (z. B. Millimole im Cubikcentimeter) aufgetragen und K und m sind eindeutig bestimmt, während in unserem Falle das Größen-

[1]) Lehrb. d. allg. Chemie, II. Aufl., 3, 232.
[2]) H. Freundlich, Zeitschr. f. physik. Chemie, S. 392 u. 393.

verhältnis der verwendeten Abszissen und Ordinateneinheiten in keiner uns derzeit bekannten Korrelation steht und der Willkür überlassen ist, da die Kenntnis der vorauszusetzenden funktionellen Beziehung zwischen Koagulierbarkeitsänderung und Konzentration des adsorbierten Salzes noch aussteht. Daß für die Beeinflussung der Hitzekoagulation nicht die bei den verschiedensten Wirkungen konzentrierterer Neutralsalze auf Wasser und auf hydrophile Kolloide betrachtete Reihenfolge SCN, Cl, SO_4 gilt, lehrt ein

Fig. 4.



Blick auf die Tabelle, welche über die relativen Werte von *K* orientiert. Dieses steigt in der Reihenfolge Cl, SCN, SO_4. Die graphisch ermittelten Werte von $m_{Cl} = 0{,}422$, $m_{SCN} = 0{,}295$, $m_{SO_4} = 0{,}238$ weisen gleichfalls auf diese Reihe.

Über Konzentrationen von 0,1 n hinaus gilt für unser reines Eiweiß die Exponentialformel nicht, entsprechend der zunehmenden Komplikation des Vorganges durch eine offenbar sekundäre Neutralsalzwirkung. Daß diese eine gewisse Verwandtschaft zu den Neutralsalzfällungen von nativem Eiweiß hat, ist von vornherein zu erwarten. Schon Hofmeister hat die gleiche Reihenfolge der fällenden Salze bei sehr verschiedenen hydrophilen Kolloiden nachgewiesen und es ist ja späterhin wiederholt von dem einen von

uns und sehr eingehend von Spiro[1]) auf den Zusammenhang dieser Neutralsalzfällungen mit anderen Salzwirkungen auf das wässerige Lösungsmittel hingewiesen worden.

Die Versuche von Bayliss, H. Freundlich und jüngst Höber[2]) unterstützen diese Auffassung von neuen Seiten her. Es liegt deshalb nahe, anzunehmen, daß so, wie das native Eiweiß, Leim und andere hydrophile Kolloide auch die durch Hitze denaturierten Eiweißteilchen bei steigendem Salzgehalte einer koagulierenden Neutralsalzwirkung unterworfen sein werden. Die Verwandtschaft dieser Erscheinung mit den bekannten Salzeiweißfällungen äußert sich darin, daß auch hier die fällenden Fluoride, Sulfate, Oxalate, Tartrate mit zunehmender Konzentration die Hitzegerinnbarkeit fördern, während sie durch Rhodanide und Jodide völlig aufgehoben wird. Acetat, Chlorid, Nitrat stehen in der Mitte. Es wäre verfrüht, über den Hinweis auf diese allgemeine Beziehung hinauszugehen, bevor die im Gange befindlichen Versuche über das Verhalten von amphoterem Eiweiß gegen konzentrierte Neutralsalze zum Abschluß gebracht sind.

III.

Jedes Bemühen nach einem tieferen Verständnis der Vorgänge bei der Hitzegerinnung von Eiweiß muß an zwei fundamentale Tatsachen anknüpfen: Die sehr vollkommene Hitzekoagulation von salzfreiem Eiweiß und ihre Behinderung durch Elekrolyte. Aus diesen Tatsachen ergibt sich die Ablehnung aller Erklärungen, die in der Hitzegerinnung eine Ausfällung durch die Salzionen erblicken, begünstigt durch die Steigerung der Ionisation mit der Temperaturerhöhung. Das amphotere Eiweiß bildet vielmehr nach dem eben Angeführten bei Anwesenheit von Neutralsalz allem Anscheine nach, und zwar nicht erst infolge der Temperaturerhöhung, Verbindungen mit den Salzionen, welche den Charakter von Adsorptionsverbindungen besitzen. Da das gelöste Eiweiß nachweislich ein heterogenes System aus dispersen gequollenen Teilchen in einer flüssigen Phase bildet, so steht nichts im Wege, sich die Ioneneiweißverbindung als eine die Eiweißteilchen mehr oder weniger vollständig umhüllende Schicht adsorbierter Salzpartikel vorzustellen.

Man kann diese Anschauung auf mehrfache Art stützen. So hat es sich in einer größeren Untersuchung, die in unserem Institut

---

[1]) Diese Beiträge **4**, 313 ff.
[2]) Ebenda **11**, 35.

von dem einen von uns (Pauli) in Gemeinschaft mit H. Leo Brüll ausgeführt wurde, herausgestellt, daß ganz analog den Verhältnissen bei der Hitzekoagulation die Alkoholfällung von amphoterem Eiweiß bei Zimmertemperatur durch Elektrolyte ausnahmslos und von niedrigen Konzentrationen relativ am stärksten gehemmt wurde. Über diese Versuche wird noch besonders berichtet werden.

Ein anderer Weg ergibt sich aus folgendem Gedankengang: Eiweiß erhöht schon in geringen Konzentrationen die innere Reibung von Wasser sehr beträchtlich, während diese von anorganischen Salzen in Konzentrationen bis 0,05 n nur in sehr geringem Ausmaß verändert wird. — Da nun unter sonst gleichen Bedingungen die innere Reibung einer Eiweißlösung nur von der Beschaffenheit der Oberfläche der Eiweißteilchen abhängen wird, so sind mit Änderung derselben Änderungen der inneren Reibung der Eiweißlösung zu erwarten. Denkt man sich die begrenzenden Flächen der Eiweißpartikel mehr oder minder mit Salzteilchen beladen, so wird eine Abnahme der inneren Reibung der Lösung in dem Grade möglich sein, als die Reibung statt zwischen Wasser und Eiweiß zwischen Wasser und Salz erfolgt. Gewiß kann diese Vorstellung nur ein grobes und unvollkommenes Bild der Wirklichkeit vermitteln, doch hat sich bisher ein auffallender Widerspruch mit der Erfahrung nicht ergeben. Es wurde nämlich regelmäßig gefunden, daß neutrale Salze, welche an sich die Viskosität von reinem Wasser erhöhen, die innere Reibung von amphoterem Eiweiß ausnahmslos erniedrigen.

Die Versuche wurden in der üblichen[1]) Weise ausgeführt. Mit Rücksicht auf die geringen Unterschiede der Reibungskoeffizienten bei niedriger Salzkonzentration wurde auf die Wahl passender Reibungsröhren, die exakte Regulierung des Thermostaten, auf eine größere Zahl von Bestimmungen der Durchströmungszeiten, aus denen das Mittel genommen wurde, Gewicht gelegt. Das spezifische Gewicht wurde für die meisten Lösungen mit einem Ostwald-Sprengelschen Pyknometer von 20 cm³ Inhalt und nur bei einigen hohen Salzkonzentrationen (siehe Tab. VIII u. IX) mit einem Regnaultschen Pyknometer von 25 cm³ Volumen bestimmt. Die Temperatur des Thermostaten betrug 24,5° C und schwankte nur um $\pm$ 0,02 Celsiusgrade. Die Salzkonzentrationen wurden bis 0,05 n durch passende Mischungen einer $n/_{10}$-Lösung, für hohen Salzgehalt durch Zusatz einer zu dem gemessenen Volumen von

---

[1]) Otswald-Luther, Physikochemische Messungen, II. Aufl.

Wasser bzw. Wassereiweißgemisch zugewogenen Salzmenge bereitet. Da die in der Literatur niedergelegten Daten für die Reibungskoeffizienten und spezifischen Gewichte von Salzlösungen sich nur auf die gebräuchlichen Äquivalentlösungen beziehen und zum größten Teil für unsere niedrigen Konzentrationen gar nicht vorliegen, erwies es sich als notwendig, auch diese Größen festzustellen. Alle Lösungen wurden mit unserem Laboratoriumswasser angesetzt, das nur einmal destilliert war, wie das bei der Dialyse unseres Rinderserums verwendete Wasser. Die Dichten der Lösungen sind aus rechnerischen Gründen sämtlich auf Wasser von 24,5° C, unsere Versuchstemperatur, bezogen. In den folgenden Tabellen bedeutet c die Konzentration, S und S' die Dichten der Salzlösungen bzw. Salzeiweißgemische, η und η' die zugehörigen Reibungskoeffizienten. Da es nach den Erfahrungen über Leimquellung nicht ausgeschlossen erschien, daß die Salze den Quellungsgrad der Eiweißteilchen und damit die Dichte des absorbierten Wassers ändern, wurde auf die Werte S' besonders geachtet; es zeigte sich jedoch kein anomaler Gang derselben für Salzeiweiß. Interpolationen von S und η Werten sind durch ein beigesetztes Sternchen kenntlich gemacht.

Tabelle VI.

Eiweiß A.

c		0,00 n	0,01 n	0,02 n	0,03 n	0,04 n	0,05 n
NaCl	S . .	1,000 00	1,000 28	1,000 90	1,001 36	1,001 49	1,001 90
	S' . .	1,004 20	1,004 73	1,005 21	1,005 61	1,005 86	1,006 12
	η . .	1,000 0	—	1,004 9	—	1,021 9	1,030 4
	η' . .	1,104 9	1,099 8	1,089 2	1,096 1	1,100 3	1,103 4
NaSCN	S . .	1,000 00	1,000 05	1,000 34	1,000 54	1,001 25	1,007 15
	S' . .	1,004 20	1,004 21	1,004 62	1,005 07	1,005 10	1,005 51
	η . .	1,000 0	1,000 9	1,005 9	1,007 5	1,009 8	1,014 9
	η' . .	1,104 9	1,098 4	—	1,098 0	—	1,092 5
Na_2SO_4	S . .	1,000 00	1,000 89	1,001 13	1,002 26	1,002 63	1,003 60
	S' . .	1,004 20	1,004 98	1,005 78	1,006 40	1,007 00	1,008 23
	η . .	1,000 0	1,000 9	—	1,011 9	—	1,023 1
	η' . .	1,104 9	1,080 4	—	1,075 0	—	1,078 0

Während die reinen Salze NaCl, NaSCN, Na_2SO_4, $CaCl_2$, KSCN in den Konzentrationen 0,01 bis 0,05 n die Viskosität des Wassers erhöhen, wird die Viskosität von amphoterem Eiweiß durch dieselben ausnahmslos unter die des reinen Eiweißes erniedrigt.

Tabelle VII.

Eiweiß C.

c		0,00 n	0,01 n	0,02 n	0,03 n	0,04 n	0,05 n
KSCN	S . .	1,000 00	1,000 32*	—	1,000 64*	—	1,002 26
	S' . .	1,002 84	1,001 38*	—	1,001 75*	—	1,004 88
	η . .	1,000 0	1,020 1	—	1,020 1	—	1,011 9
	η' . .	1,068 4	1,069 5 (?)	—	1,066 9	—	1,060 8
$CaCl_2$	S . .	1,000 00	—	—	1,001 08*	—	1,001 80
	S' . .	1,002 84	1,003 19	—	1,003 88	1,004 23	1,004 58
	η . .	1,000 0	—	—	1,008 0	—	1,006 4
	η' . .	1,068 4	1,056 3	—	1,055 5	1,0574	1,062 4

Fig. 5.

Bei NaCl und $CaCl_2$ zeigt sich sehr deutlich ein Minimum von η', das bei 0,02 und 0,04 n liegt. Beim KSCN liegen besondere Verhältnisse vor. Daß es wie andere Kalium- und Ammoniumsalze in höheren Konzentrationen die Viskosität des Wassers erniedrigt, ist bekannt. Wir fanden aber durch Kontrollversuche bestätigt, daß dieser Erniedrigung in Konzentrationen bis 0,1 n eine Erhöhung vorausgeht, die bei 0,05 n ein Maximum hat, wenigstens für unser Mercksches Präparat und unser destilliertes Wasser.

Die Reibung einer Eiweißsalzlösung wird nicht allein durch die Beschaffenheit der Eiweißteilchen, sondern auch durch die zwischen denselben befindliche Lösung bestimmt. Solange die Konzentration derselben gering ist, wird die innere Reibung des Gemisches vorwiegend von dem Zustande der Eiweißteilchen abhängen, wächst der Gehalt an Salz, dann muß dessen Einfluß auf

die Viskosität der zwischen den Eiweißteilchen befindlichen Flüssigkeit immer mehr zur Geltung kommen. Bei Salzen, die die Viskosität des Wassers erhöhen, wird also die innere Reibung der Eiweißsalzmischung ein Minimum passieren, dann zunehmen und schließlich die Reibung des reinen Eiweißes übertreffen. Das obige Minimum der Viskosität bei $CaCl_2$- und NaCl-Eiweiß ist eine Andeutung dieses Verhaltens, das in den folgenden Versuchen bei höherer Konzentration noch deutlicher wird.

Tabelle VIII.

Eiweiß B.

c	NaCl				
	S	S'	η	η'	η''
0,00 n	1,000 00	1,003 00	1,0000	1,0783	—
0,05 n	1,001 90	1,005 44	1,0304	1,0592	1,1087
0,1 n	1,004 43	1,007 68	1,0435	1,0681	1,1218
0,5 n	1,019 44	1,002 22	1,0854	1,1064	1,1637
1 n	1,038 76	1,041 59	1,1322	1,1596	1,2105
2 n	1,075 58	1,080 54	1,2467	1,3005	1,3250

Tabelle IX.

Eiweiß B.

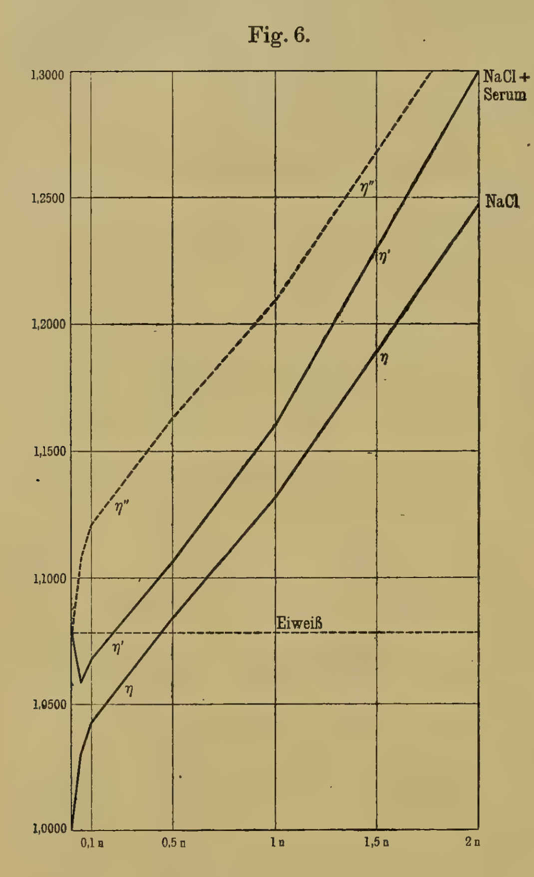
c	$(NH_4)_2SO_4$				
	S	S'	η	η'	η''
0,00 n	1,000 00	1,003 00	1,0000	1,0783	—
0,05 n	1,002 02	1,005 12	1,0019	1,0582	1,0802
0,1 n	1,004 12	1,006 79	1,0251	1,0725	1,1034
0,5 n	1,018 84	1,022 22	1,0649	1,1020	1,1432
1 n	1,036 59	1,039 53	1,1295	1,1746	1,2078
2 n	1,066 50	1,071 03	1,2334	1,3305	1,3117

Erst in einer Konzentration oberhalb 0,1 n wird somit bei NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ das η' von reinem Eiweiß durch den Reibungskoeffizienten der Salzeiweißlösung übertroffen. Eine gute Anschauung davon gibt die Fig. 6, welche das Verhalten von NaCl in Wasser und Eiweiß illustriert.

Aus Versuchen mit indifferenten Substanzen (s. u.) ergibt sich, daß in solchen Fällen η' die Summe aus der Reibung der reinen Eiweißlösung und der Viskositätsänderung von Wasser durch den

kristalloiden Stoff darstellt. In den Tabellen ist der in dieser Art berechnete Wert in der Reihe η'' angeführt. Mit Ausnahme der einen Zahl für $2\,n\,(NH_4)_2SO_4$ liegt das gefundene η' stets unterhalb des berechneten η''. Die Erniedrigung der Reibung von Eiweiß durch zugesetztes Salz hält also bis in hohe Konzentrationen an, eine für die Theorie der Erscheinung wichtige Feststellung.

Fig. 6.



Von besonderem Interesse ist der Gang der Viskositätsänderung beim Kaliumrhodanid (Tab. X). Dasselbe erhöht in niederen Konzentrationen die innere Reibung von Wasser und demgemäß ist der korrespondierende Abschnitt der Reibungskurve des Salzeiweißes ähnlich wie bei den Salzen in Tabelle VIII und IX. Bei höherem Gehalt an KSCN wird aber die Reibung von Wasser und entsprechend vom Salzeiweiß zunehmend erniedrigt.

Es müßte also die Kurve des Salzeiweißes, die anfangs durch ein Minimum geht, umkehren und absinken, was auch wirklich der Fall ist (Fig. 7). Die zugehörigen η''-Werte sind hier natürlich durch Subtraktion von $1 - \eta$ von der Viskositätskonstanten des reinen Eiweißes gewonnen; sie liegen auch hier stets höher als die tatsächlich gefundenen η'-Werte.

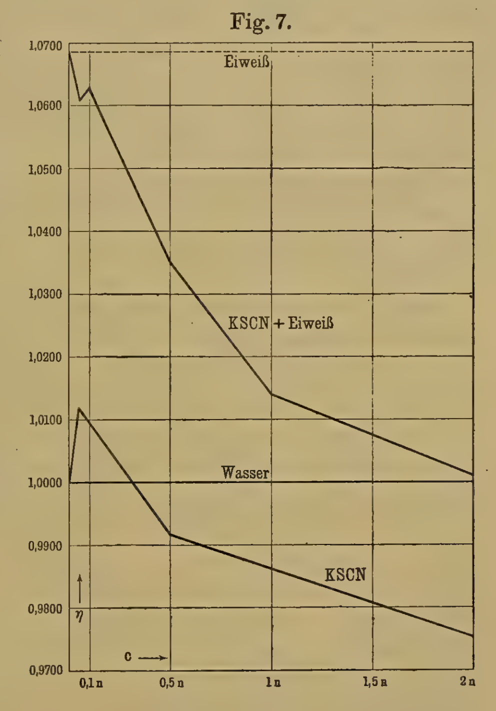
Durch die Feststellung, daß sämtliche untersuchten Salze die innere Reibung von amphoterem Eiweiß erniedrigen, wird die aus den Erscheinungen bei der Hitzekoagulation abgeleitete Annahme der Bildung von Adsorptionsverbindungen zwischen Salz und

Tabelle X.
Eiweiß C.

c	KSCN				
	S	S'	η	η'	η''
0,00 n	1,000 00	1,002 84	1,0000	1,0684	—
0,05 n	1,002 26	1,004 88	1,0119	1,0608	—
0,1 n	1,004 19	1,007 00	—	1,0631	—
0,5 n	1,019 63	1,022 23	0,9916	1,0351	1,0600
1 n	1,042 73	1,043 06	—	1,0139	1,0592
2 n	1,079 58	1,081 25	0,9754	1,0010	1,0478

amphoterem Eiweiß sehr gestützt. Die Tatsache, daß die Erniedrigung der inneren Reibung von Eiweiß auch in den hohen Salzkonzentrationen in der gleichen Weise fortbesteht, solange es nicht zu einer Ausfällung kommt, steht mit der Annahme von Adsorptionsverbindungen vollkommen in Übereinstimmung, da solche nur durch Verdünnung, nicht aber durch Konzentrierung der äußeren Lösung reversibel sind.

Fig. 7.



IV.

So wertvoll die Übereinstimmung der Ergebnisse bei der Hitzekoagulation (und Alkoholfällung) von amphoterem Eiweiß in Anwesenheit von Neutralsalzen mit den durch die Untersuchung der inneren Reibung von Eiweißsalzmischungen gewonnenen Resultaten für die Theorie erscheint, so läßt sie immerhin den Einwand zu, daß dieses Zusammentreffen auch ein zufälliges sein kann. Dieses Bedenken gewinnt dadurch an Gewicht, daß eine befriedigende Theorie der so mannigfaltigen Beobachtungen über die

innere Reibung verschiedener Lösungen und Mischungen, die eine sichere Vorhersage gestatten würde, bisher nicht existiert. Die von Arrhenius[1]) empirisch abgeleitete Exponentialformel ist weit davon entfernt, allgemeine Gültigkeit zu besitzen, vielmehr ist ihr Zutreffen von zufälligen Umständen abhängig (vgl. Rudorf[2]). Wiewohl bei wässerigen Lösungen von so niederem Gehalt, wie wir sie zum Teil benutzten (0,01 bis 0,05 n), im allgemeinen die theoretisch für die vollständige Ionisation zunächst vorauszusetzende lineare Abhängigkeit des η von der Konzentration auch gefunden wurde, so lehrt doch der Fall des KSCN, daß in sehr schwachen Konzentrationen die Reibung von Wasser erhöht, dann durch ein Maximum führt und schließlich erniedrigt, daß schon in homogenen Systemen unerwartete komplexere Erscheinungen auftreten können. Ein Gegenstück zum Verhalten von KSCN bietet ein Nichtelektrolyt in wässeriger Lösung, der Harnstoff (s. u.), der in geringen Konzentrationen die Reibung des Wassers erniedrigt, in höheren steigert. Unter solchen Verhältnissen erscheint es überaus schwierig, Beobachtungen über Änderungen der inneren Reibung in heterogenen Systemen, wie es die Eiweißlösung ist, eindeutig zur Unterstützung einer bestimmten Annahme, in unserem Fall für das Bestehen von Adsorptionsverbindungen zwischen Salzionen und amphoterem Eiweiß, zu verwerten. Diese Lücke in der Beweisführung hat sich durch eine Reihe experimenteller Feststellungen ausfüllen lassen.

Es gibt nämlich Substanzen, Nichtelektrolyte, die die Hitzegerinnung von amphoterem Eiweiß, zumal in geringen Konzentrationen, nur wenig hemmen. In diesen Fällen bleibt auch die Herabsetzung der inneren Reibung der Mischung mit amphoterem Eiweiß vollständig oder nahezu vollkommen aus. Ein schlagendes Beispiel dafür liefern Rohr- und Traubenzucker[3]), über deren Einfluß auf die Hitzegerinnung die folgende Tabelle belehrt.

Tabelle XI.

Substanz	0,0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,1	0,3	0,5
Rohrzucker . .	64,63	65,2	65,5	65,8	65,8	66,0	—	68,4	70,4
Traubenzucker	63,7	63,8	64,0	64,5	65,0	66,0	—	—	—

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 1, 285.
[2]) Ebenda 43, 289.
[3]) Bezüglich der Versuche von Starke über den Einfluß von Traubenzucker auf die Hitzekoagulation, vgl. Fußnote S. 420.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß allerdings auch die geprüften Nichtelektrolyte eine Hemmungswirkung der Hitzegerinnung entfalten, indem sie die Gerinnungstemperatur erhöhen. Die Erhöhung ist jedoch sehr geringfügig. Sie erreicht erst bei der 50fachen Konzentration des Nichtelektrolyten und darüber den Wert, den sie bei Elektrolyten aufweist. Außerdem ist der Gang der Behinderung in beiden Fällen völlig verschieden. Bei den Elektrolyten in niederer Konzentration relativ bedeutend, nimmt sie mit höheren nur sehr wenig zu, bei den geprüften Zuckern hingegen ist die Hemmung der Hitzegerinnung in geringen Konzentrationen unbedeutend und wächst gleichmäßig mit steigendem Zusatz des Nichtelektrolyten. Man wird daher an einen verschiedenen Mechanismus der Koagulationshemmung bei Elektrolyten und bei Nichtelektrolyten denken müssen. Bei der ersteren Bildung von Adsorptionsverbindungen, im zweiten Fall eher eine räumliche Behinderung der Vereinigung zu größeren Aggregaten durch die zunehmende Zahl von zwischen den Eiweißteilchen befindlichen Teilen des Nichtelektrolyten. Eine Beförderung der Hitzegerinnung bei sehr hoher Konzentration des zugesetzten Zuckers, wie sie bei vielen fällenden Salzen (Sulfate usw.) zur Beobachtung kam, ist nicht beobachtet worden. In gleichem Sinne wie die Versuchsergebnisse bei der Hitzegerinnung sprechen die Resultate der inneren Reibung von Zucker-[1]) und Zuckereiweißlösungen.

Tabelle XII.

Eiweiß C.

c	Traubenzucker				
	S	S'	η	η'	η''
0,00 n	1,000 00	1,002 84	1,0000	1,0684	—
0,0173 n	1,001 15	1,001 93	1,0089	1,0755	1,0773
0,0346 n	1,002 32	1,003 67	1,0162	1,0880	1,0846
0,0519 n	1,003 46	1,005 21	1,0235	1,0947	1,0919
0,0692 n	—	1,006 85	1,0328*	1,1003	1,1012
0,0865 n	1,005 78	1,008 49	1,0420	1,1075	1,1104

[1]) Durch einen Zufall wurden die Rohr- und Traubenzuckerlösung nicht von der gleichen Normalität, sondern von gleichem gewichtsprozentischen Gehalt hergestellt. Solche gleichprozentige Lösungen haben interessanterweise ein gleiches η (vgl. Tabelle XII u. XIII). Auch Mannit und Milchzucker dürften (bei 24,5°) mit Rohrzucker und Dextrose im η-Werte übereinstimmen, wenigstens in einprozentiger Lösung. Das würde aus der Tabelle II von Arrhenius (l. c., S. 290) hervorgehen. Diese Erscheinung wäre eines näheren Studiums wert.

Tabelle XIII.

Eiweiß C.

c	Rohrzucker				
	S	S'	η	η'	η''
0,00 n	1,000 00	1,002 84	1,0000	1,0684	—
0,01 n	1,001 26*	1,004 05	1,0089	1,0764	1,0773
0,02 n	—	1,005 26	—	1,0830	—
0,03 n	1,003 77*	1,006 46	1,0233	1,0952	1,0917
0,04 n	—	—	—	—	—
0,05 n	1,006 28	1,008 88	1,0395	1,1071	1,1079
0,1 n	1,012 15	1,014 74	1,0882	1,1548	1,1566
0,3 n	1,035 62	1,038 17	1,3088	1,3813	1,3772
0,5 n	1,059 08	1,061 60	1,5626	1,6421	1,6310

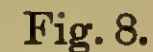
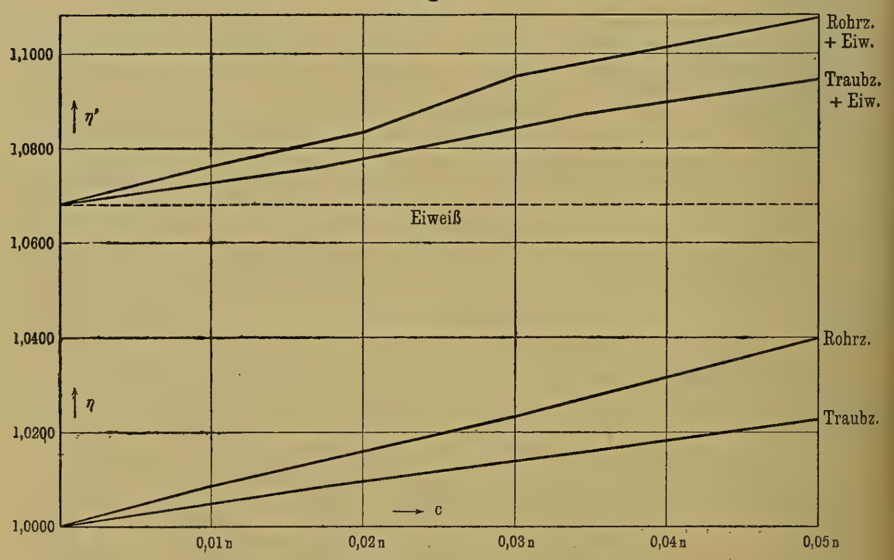


Fig. 8.



In diesen Versuchen findet sich keine Erniedrigung der Viskosität von Eiweiß durch den zugesetzten Zucker. Die Figur zeigt ansteigende, fast parallele Geraden. Die Werte η' und η'' fallen nahe zusammen. Weder beim Rohr-, noch beim Traubenzucker findet sich im Gegensatz zu den Elektrolyten ein Anhaltspunkt für die Bildung von Adsorptionsverbindungen mit reinem Eiweiß, eine Feststellung, die auch in anderer Hinsicht für den Physiologen [1]) von Interesse ist.

---

[1]) Vgl. L. Michaelis u. P. Rona, Biochem. Zeitschr. 7, 329 u. 8, 356.

Für den Harnstoff läßt sich dartun, daß ihm nur ein sehr geringes Hemmungsvermögen für die Hitzegerinnung von amphoterem Eiweiß zukommt, das ganz von der Größenordnung des bei den Sacchariden beobachteten ist. Über diese Verhältnisse und den Einfluß von Harnstoff auf Hitzegerinnung und Viskosität von Wasser- und Eiweißlösung geben die beiden nächsten Tabellen Auskunft.

Tabelle XIV.

	0,0	0,02	0,03	0,04	0,05	0,5
Harnstoff	64,63	64,72	64,9	65,4	65,9	67,2

Tabelle XV.

Eiweiß C.

c	Harnstoff				
	S	S'	η	η'	η''
0,00 n	1,000 00	1,002 84	1,0000	1,0684	—
0,01 n	1,000 08*	1,002 91*	0,9988	1,0635	1,0672
0,02 n	1,000 15*	1,002 98*	0,9976	1,0629	1,0660
0,03 n	1,000 22*	1,003 05*	0,9976	1,0624	1,0660
0,04 n	1,000 29*	1,003 12*	0,9977	1,0618	1,0661
0,05 n	1,000 36	1,003 19	0,9961	—	—
0,1 n	1,000 72*	1,003 54*	0,9961	1,0605	1,0645
0,3 n	1,002 16*	1,004 94*	0,9977*	1,0658	1,0661
0,5 n	1,003 60*	1,006 34*	1,0029*	1,0735	1,0713

In bezug auf die innere Reibung von Harnstoff- und Harnstoffeiweißlösung bestehen eigene Verhältnisse. Wir haben gefunden, daß der Harnstoff unter allen von uns untersuchten Substanzen eine Sonderstellung einnimmt, indem er in niederen Konzentrationen die Reibung des reinen Wassers herabsetzt und erst mit wachsendem Gehalt zwischen 0,3 n und 0,4 n erhöht. Die Reibung geht also bei reinem Harnstoff durch ein Minimum (bei 0,1 n). Dieses eigentümliche Verhalten der Viskosität von wässerigen Harnstofflösungen wurde bereits von Rudorf[1]) entdeckt. Er hat auf Grund dieser Beobachtung an einem Nichtelektrolyten mit Recht gegen die alleinige Zurückführung solcher Erniedrigungen der inneren Reibung des Wassers durch gelöste Kristalloide auf Elektrostriktion Einspruch erhoben. Dieser Erklärung wiedersprechen übrigens

[1]) l. c., kam uns erst nachträglich zur Kenntnis.

auch unsere sonstigen Beobachtungen über die innere Reibung von Elektrolytlösungen, die bei einer Reihe vollständig ionisierter, sehr verdünnter Lösungen Erhöhung und beim KSCN gerade in hohen Konzentrationen mächtige Erniedrigung der Viskosität ergaben.

Einen vollständig ähnlichen Verlauf wie bei der reinen Harnstofflösung zeigt die Kurve für die innere Reibung von Harnstoffeiweißlösungen, deren Minimum gleichfalls bei 0,1 n liegt. Allerdings finden sich hier zum Unterschiede vom Zucker alle berechneten η''-Werte höher als die beobachteten η', also ähnlich wie bei den Elektrolyten. Es kommt demnach auch bei Harnstoffzusatz zum Eiweiß zu einer relativen Erniedrigung der Viskosität. Diese ist lange nicht so bedeutend wie bei den Elektrolyten. Das zeigt der Vergleich der η'- und η''-Reihen in beiden Fällen. Bei der Regelmäßigkeit der Erniedrigung und der großen Sorgfalt, die auf die Konstanz der Versuchsbedingungen in unseren Viskositätsmessungen verwendet wurde, kann das Bestehen einer Herabsetzung der Reibung von Eiweiß durch Harnstoff trotz ihres kleinen Wertes als sicher angenommen werden. Die Möglichkeit einer Art Bindung von Harnstoff durch das Eiweiß wird man also gelten lassen müssen, eine Auffassung, die auch durch chemische Erwägungen gestützt werden kann. — Da eine räumliche Behinderung der Ausflockung durch den niedrig molekularen Harnstoff bei der Hitzekoagulation nicht in dem Maße zu erwarten ist, wie bei den Zuckern, so würde auch die geringe Hemmung der Hitzegerinnung von amphoterem Eiweiß durch verdünnte Harnstofflösungen im Sinne einer Harnstoffeiweißverbindung gedeutet werden können. In der Tat ist eine ähnliche Ansicht schon vor längerer Zeit von Spiro[1]) ausgesprochen worden, der am nativen Hühnereiweiß eine starke Hemmung der Hitzekoagulation durch hochkonzentrierte Harnstofflösungen (von etwa 5 n ab) nachgewiesen hat. Spiro betrachtet die Harnstoffeiweißverbindung als analog einem Alkalialbuminat, wofür sich gewisse Anhaltspunkte aus Beobachtungen an verschiedenen, basischen organischen Stoffen, aus der Ähnlichkeit der Koagulate in allen diesen Fällen und aus der Art der Behinderung der Esterverseifung durch H_2SO_4 in Anwesenheit von Harnstoff ergaben.

Die geringfügigen, aber doch merklichen Abweichungen im Verhalten verdünnter Harnstoffeiweißlösungen lassen sich ohne Zwang aus besonderen Umständen erklären.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 182.

Im allgemeinen spricht also die geringe Änderung der Hitzekoagulation und das parallele Verhalten der inneren Reibung von Eiweißlösungen, denen die erwähnten Nichtleiter zugesetzt wurden, jedenfalls auch für den inneren Zusammenhang dieser physikalisch-chemischen Eigenschaften und darf zugleich als eine weitere Unterstützung unserer Annahme der Adsorptionsbindung von Salzionen an das amphotere Eiweiß betrachtet werden.

Zugleich ist darin der Hinweis auf die Mitwirkung elektrischer Kräfte bei der Entstehung dieser Verbindungen enthalten, worüber noch von weiteren Untersuchungen Aufklärung zu erwarten ist.

Ganz parallele Unterschiede zwischen Elektrolyten und Nichtleitern konnten Pauli und L. Brüll in unserem Institute bei der Alkoholfällung von Eiweiß beobachten: während diese durch kleine Elektrolytzusätze mächtig gehemmt wird, bewirken Nichtleiter erst in hohen Konzentrationen eine mäßige Behinderung.

Soweit es bisher untersucht ist, steigern also im Gegensatze zu Nichtelektrolyten die Salzionen in Konzentrationen, bei denen es nicht zu einer sekundären Neutralsalzwirkung kommt, in hohem Maße die Stabilität von amphoterem Eiweiß gegen gewisse Fällungswirkungen. Das Euglobulin, welches schon in reinem Wasser ausflockt — eine Fällung die, wie der eine von uns (P.) zum ersten Male konstatierte, nur durch Elektrolyte, nicht aber durch Nichtelektrolyte (Harnstoff, Zucker) in niederen und mittleren Konzentrationen gehemmt wird —, erscheint dann nur als ein Spezialfall dieser allgemeinen Gesetzmäßigkeit. Der früher unter anderem aus Beobachtungen über die Löslichkeitsbedingungen des Globulins zuerst gezogene Schluß auf das Bestehen von Salzioneneiweißverbindungen hat durch die gegenwärtigen Versuche eine breitere Grundlage erhalten.

V.

Die bisherigen Versuche haben sich im wesentlichen auf neutrale Salze bezogen. Bei nicht neutralen oder stark hydrolytisch dissoziierenden waren im vorhinein besondere Verhältnisse zu erwarten; darauf wiesen schon einige oben erwähnte Beobachtungen über die Hitzegerinnung in Anwesenheit von Acetat, Oxalat und Citrat hin. Wiewohl eine vollständige Analyse der Beziehungen von Eiweiß zu nicht neutralen Salzen erst nach den folgenden Untersuchungen am Alkali- und Säureeiweiß sich ergeben wird, erscheint es im Zusammenhang mit den mitgeteilten

Versuchen geboten, jene Erfahrungen über die Einwirkung nicht neutraler Salze aufs Eiweiß wiederzugeben, die den Parallelismus von Hitzekoagulationsänderung und innerer Reibung von Salzeiweiß betreffen. Hatte früher einer gewissen Hemmung der Hitzekoagulation eine beträchtliche Erniedrigung der inneren Reibung von Salzeiweiß, einem Fehlen der Hitzekoagulationsänderung auch ein Wegfall der Erniedrigung der Reibung entsprochen, so waren hier ganz andere Beziehungen vorauszusetzen. Denn die Hitzekoagulation von amphoterem Eiweiß wird durch elektrische Ladung desselben mit Hilfe von OH und H-Ionen mächtig gehemmt oder vollständig aufgehoben, die innere Reibung jedoch bedeutend erhöht.

Bei der Einwirkung von nicht neutralen oder stark hydrolytisch dissoziierenden Salzen war also eine Behinderung der Hitzekoagulation, zugleich aber eine relativ höhere Reibung zu erwarten. Die Hemmung der Hitzegerinnung kann viel bedeutender werden als bei neutralen Salzen. Das zeigen die folgenden Beispiele eines Salzes mit freien H-Ionen ($AlCl_3$) und zweier Salze mit freien OH-Ionen.

Tabelle XVI.

Eiweiß C. $AlCl_3$.

0,00 n	0,001 n	0,002 n	0,003 n	0,004 n	0,005 n
64,63°	+	61,75°	69,8°	84°	klar

$AlCl_3$ verhält sich kompliziert wegen der Mitwirkung der Metallhydroxydfällung. In sehr schwachen Konzentrationen (0,001 n) tritt in der Kälte schon Trübung ein, die mit dem Erwärmen wächst. Aus diesem Verhalten resultiert noch eine scheinbare Beförderung der Hitzekoagulation bei 0,002 n, die mit Hervortreten der H-Ionenwirkung in Hemmung umschlägt, welche bei 0,005 n vollständig wird und mit wachsendem Salzgehalt bis 2 n anhält. Bei dieser Konzentration (2 n) ist offenbar infolge Zurückdrängung der Hydrolyse wieder eine Hitzekoagulation möglich; mit weiterer Salzzunahme tritt ungefähr bei 3 n Neutralsalzfällung bei Zimmertemperatur ein. Zur Illustration der Beteiligung hydrolytisch abgespaltener HCl an der Hemmung der Hitzegerinnung von $AlCl_3$ möge dienen, daß unser Eiweiß noch mit 0,0001 n HCl versetzt beim Kochen ganz klar war und erst bei Zusatz von 0,00001 n HCl opak koagulierte.

Die innere Reibung von amphoterem Eiweiß wird durch geringe Säurezusätze mächtig gesteigert. Die Werte der folgenden

Tabelle zeigen dies für HCl an. Die Maximumbildung und andere Erscheinungen, die dabei hervortreten, sollen hier nicht erörtert werden.

Tabelle XVII.

Eiweiß C.

c	HCl			
	S	S'	η	η'
0,000 n	1,000 00	1,002 84	1,000 0	1,0684
0,005 n	—	1,002 89	—	1,1123
0,01 n	—	1,002 94	—	1,1518
0,02 n	—	1,003 10	—	1,2734
0,03 n	—	1,003 36	—	1,2134
0,04 n	—	1,003 50	—	1,1719
0,05 n	1,000 88	1,003 66	1,014 96	1,1445
0,1 n	1,001 78	1,004 60	1,066 90	1,1142

Auch die innere Reibung von $AlCl_3$-Eiweiß zeigt im Gegensatz zu den Verhältnissen bei neutralen Elektrolyten eine Erhöhung schon bei niederem Salzgehalt.

Tabelle XVIII.

Eiweiß C.

c	$AlCl_3$			
	S	S'	η	η'
0,000 n	1,000 00	1,002 84	1,0000	1,0684
0,001 n	—	1,002 89*	—	1,0684
0,002 n	—	1,002 93*	—	1,0759
0,003 n	—	1,002 97*	—	1,0812
0,004 n	—	1,003 01*	—	1,0870
0,005 n	—	1,003 05*	—	1,0760
0,01 n	1,000 40	1,003 25*	1,0173	1,0770
0,03 n	1,001 20	1,004 06*	1,0265	1,0869
0,05 n	1,002 00	1,004 87	1,0374	1,1345

Bei 0,004 n liegt ein Maximum von η', dem bei 0,05 n eine Senkung folgt, von welcher an die Viskosität mit Erhöhung der Konzentration stark zunimmt. Dieser anfängliche eigenartige Gang der Zähigkeit des $AlCl_3$-Eiweißes könnte mit der Einwirkung des $Al(OH)_3$ auf das Eiweiß zusammenhängen. Jedenfalls liegen hier noch komplizierte, weiterer experimenteller Erforschung bedürftige Einzelheiten vor. Die Erhöhung von η' bei 0,05 n $AlCl_3$ entspricht der Wirkung von etwas über 0,005 n HCl. Aus diesen Größen-

beziehungen können Rückschlüsse auf den wirklichen Hydrolysengrad von 0,05 n $AlCl_3$ schon deshalb nicht gezogen werden, weil das Eiweiß zum Teil auch von den anderen anwesenden Ionenarten in seiner inneren Reibung beeinflußt wird.

Ein strenger Parallelismus der Viskositätsänderung und der Beeinflussung der Hitzegerinnung durch hydrolytisch dissoziierende Salze ist, abgesehen von der komplizierteren Natur der Erscheinung, schon deshalb nicht möglich, weil die Hydrolyse durch die Temperaturerhöhung mächtig gesteigert wird. Daher werden auch in der Regel die Veränderungen der Koagulationstemperatur durch stark hydrolytisch gespaltene Salze ein vergrößertes und verschobenes Bild der Einwirkung auf das Eiweiß liefern. Das zeigt sich nicht minder beim $AlCl_3$ als bei den weiter untersuchten, Hydroxylionen abspaltenden Salzen, dem Na_3PO_4 und dem $NaHCO_3$. Beide hemmen in niederen Konzentrationen die Hitzegerinnung weitgehend, wie die qualitative Registrierung der Veränderung beim Aufkochen der Lösung zeigt. Eine Bestimmung der Gerinnungstemperatur war wegen der Unvollständigkeit der Gerinnung nicht möglich.

Tabelle XIX.

Eiweiß C.

	0,003 n	0,01 n	0,02 n	0,03 n	0,04 n	0,05 n
Na_3PO_4	milchig durchscheinend	opaleszent	stärker opaleszent	milchig durchscheinend	milchig durchscheinend	milchig opak
$NaHCO_3$	milchig schwach durchscheinend	stark opaleszent	—	—	—	fast klar

Tabelle XX.

Eiweiß C.

c		0,00 n	0,01 n	0,02 n	0,03 n	0,04 n	0,05 n
Na_3PO_4	S .	1,000 00	1,000 44	—	1,001 31	—	1,002 19
	S' .	1,002 84	1,003 31	1,003 78	1,004 24	1,004 71	1,005 18
	η . .	1,000 0	1,011 9	—	1,012 8	—	1,013 7
	η' .	1,068 4	1,063 8	1,068 5	1,072 7	1,078 7	1,082 3
$NaHCO_3$	S .	1,000 00	1,000 15	—	1,000 49	—	1,000 73
	S' .	1,002 84	1,003 06	1,003 28	1,003 49	1,003 71	1,003 93
	η . .	1,000 0	1,006 3	—	1,008 9	—	1,011 5
	η' .	1,068 4	1,067 7	1,068 7	1,071 2	1,071 5	1,071 7

Interessant sind die Veränderungen der inneren Reibung von Eiweiß durch diese Salze. Zum Vergleiche sind die Viskositätswerte von Laugeneiweiß zugefügt (vgl. Tab. XX).

Tabelle XXI.

Eiweiß C.

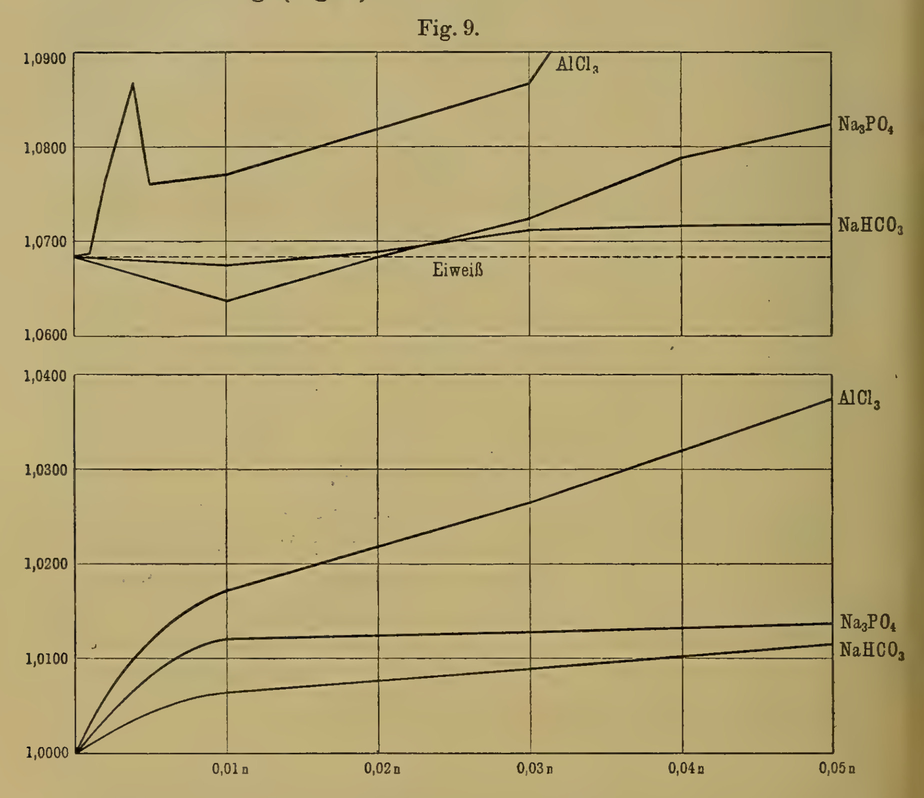
c	NaOH			
	S	S'	η	η'
0,000 n	1,000 00	1,002 84	1,0000	1,0684
0,005 n	—	1,003 00	—	1,0805
0,01 n	—	1,003 23*	—	1,1068
0,02 n	—	1,003 69*	—	1,1371
0,03 n	—	1,004 11	—	1,2098
0,04 n	—	1,004 53*	—	1,2476
0,05 n	1,002 19	1,005 00*	1,0044	1,2632
0,1 n	1,004 40	1,007 26	1,0216	1,3425

Während reine NaOH eine mächtige Steigerung der inneren Eiweißreibung veranlaßt (vgl. Tab. XXI), nehmen das Phosphat und Bikarbonat eine Mittelstellung ein zwischen dieser Laugenwirkung und der Herabsetzung der Viskosität von Eiweiß durch neutrale Elektrolyte. Die letztere Wirkung ist nur schwach angedeutet (vgl. Fig. 9) und weicht schon von 0,02 n an einer Erhöhung der inneren Reibung. Entsprechend der Hydrolysenänderung durch Temperatursteigerung bleibt die Beeinflussung der Viskosität weit hinter der Hemmung der Hitzekoagulation durch diese nicht neutralen Salze zurück.

Bei dieser Gelegenheit soll nur kurz auf die Unterschiede hingewiesen werden, die zwischen dem Gang der Viskosität der nicht neutralen und der neutralen Na-Salze in wässerigen Lösungen bestehen. Die letzteren zeigen in den niederen Konzentrationen ein lineares Wachsen des η mit steigendem Salzgehalt; bei ersteren hingegen erhebt sich der Reibungskoeffizient anfangs rascher und mit Erhöhung der Konzentration immer langsamer (Fig. 9). Dieser Verlauf der Viskositätsänderung dürfte wohl mit der Vermehrung der reibenden Teilchen durch die Hydrolyse in der stark verdünnten Salzlösung zusammenhängen. Daß dieses Verhalten der reinen Salzlösung nicht die Ursache des Ganges von η' der Salzeiweißverbindungen sein kann, zeigt der Umstand, daß, wiewohl die η-Kurve von Na_3PO_4 gänzlich oberhalb der von $NaHCO_3$ gelegen ist, die anfängliche Erniedrigung des η' beim Phosphat-

eiweiß beträchtlicher ist als beim Bikarbonateiweiß. In demselben Sinne spricht die Divergenz der η'-Kurven gegenüber der Konvergenz der η-Kurven bei den beiden Salzen. Beim Aluminiumchlorid ist der völlig differente Verlauf der η- und η'-Werte ohne weiteres sinnfällig (Fig. 9).

Fig. 9.



Wenn sich auch ein eingehenderes Verständnis der Beziehungen von nicht neutralen Salzen zum Eiweiß erst aus den folgenden Mitteilungen ergeben wird, so läßt sich doch aus dem hier mitgeteilten Material der Schluß ziehen, daß im allgemeinen die Anomalien in den Eigenschaften der mit hydrolytisch stärker gespaltenen Salzen versetzten Eiweißlösungen ihrem Sinne nach vollständig der theoretischen Vorhersage entsprechen.

* * *

Als allgemeines Ergebnis der Versuche kann die Feststellung betrachtet werden, daß Salzionen mit amphoterem Eiweiß zu Adsorptionsverbindungen zusammentreten, wobei die physikalisch-

chemischen Eigenschaften des Eiweißes markante Veränderungen erfahren. Gegenüber den früheren Untersuchungen dürfte ein gewisser Fortschritt darin liegen, daß nun physikalische Zustandsänderungen von Eiweiß unter dem Einflusse geringer Mengen von neutralen Elektrolyten nachgewiesen sind. Außerdem bestehen diese Veränderungen nicht bloß in einer Variation der Fällbarkeit, was auch von physiologischem Interesse ist, da die Ausfällung einen extremen nicht mehr im Bereiche des Physiologischen gelegenen Vorgang darstellt.

Wiewohl Untersuchungen am amphoteren Eiweiß weniger zur Übertragung auf die biologischen Verhältnisse[1]) als zur Grundlage des fortschreitenden Studiums der komplexeren Proteïnkombinationen im Organismus geeignet sind, so lassen sich denselben dennoch einige Hinweise für den Biologen entnehmen.

Von den physiologischen Funktionen der Elektrolyte, welche nicht spezifische Ionenwirkungen darstellen oder deren Beteiligung an der Regulierung des osmotischen Druckes entsprechen, war nur eine einzige aus den Eigenschaften der Eiweißkörper ableitbar. Es ist dies die Erhaltung der Stabilität des Globulins, welche von Nichtelektrolyten in selbst beträchtlichen im Organismus nicht mehr gegebenen Konzentrationen nicht besorgt werden kann. In unseren Versuchen hat sich gezeigt, daß Salze in Konzentrationen, die erheblich unterhalb der in tierischen Säften und Geweben vorhandenen gelegen sind, auffällige Abweichungen im physikalisch-chemischen Verhalten auch jener Eiweißkörper bedingen können, welche nicht Globulincharakter besitzen. Am wichtigsten erscheint da die beträchtliche Herabsetzung der inneren Reibung von Eiweißlösungen durch Neutralsalze. Dieselbe muß nicht nur bei der mechanischen Fortbewegung der tierischen Flüssigkeiten, sondern auch bei der Diffusion der eiweißartigen Biokolloide fördernd zum Ausdrucke kommen. Insbesondere die Funktion der Salze als „Schmiermittel" bei der Fortbewegung der Eiweißteilchen wird bei deren geringer absoluter Diffusionsgeschwindigkeit von Bedeutung sein. Es liegen ältere (Regeczy[2]) und neuere Untersuchungen (Okerblom[3]) über die Beförderung der Eiweißdiffusion durch Chlornatrium vor, welche durch die von uns gefundene Herab-

[1]) Vgl. diesbezüglich den Vortrag: „Kolloidchemische Studien am Eiweiß". Zeitschr. f. Kolloidchemie, kommendes Juliheft 1908.

[2]) Pflügers Arch. 34, 431; vgl. Wittich, Müllers Arch. 1856, S. 305.

[3]) Skandin. Arch. f. Physiol. 20, 102.

setzung der inneren Reibung der Eiweißlösung durch Salze einen Beitrag zur Aufklärung erhalten dürften.

Daß die toxische Wirkung von Salzen vielfach mit der Bildung von Adsorptionsverbindungen in den Zellen zusammenfallen dürfte, ist nach dem Gesagten zu erwarten. In der Tat hat Wolfgang Ostwald[1]) jüngst die Giftigkeit von Salzlösungen für Süßwassertiere als den Adsorptionsgesetzen unterworfen nachweisen können. Hier handelt es sich um ein Gebiet, das erst in den Anfängen der Entwickelung steht.

Die folgenden zum Teil schon abgeschlossenen Untersuchungen über das Alkali- und Säureeiweiß und deren Beziehungen zu Elektrolyten werden die bisher mitgeteilten in mannigfacher Hinsicht ergänzen.

April 1908.

---

[1]) Pflügers Arch. 120, 19.

XXXIV.

Darstellung und Eigenschaften des proteolytischen Leukocytenfermentes.

Von Dr. med. **G. Jochmann** und Dr. phil. **G. Lockemann.**

(Aus dem kgl. Institut für Infektionskrankheiten [Direktor Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. Gaffky] und der Infektionsabteilung des Rud. Virchow-Krankenhauses [dirig. Arzt Privatdozent Dr. Jochmann]).

Ein tryptisches Ferment im Blute bei myelogener Leukämie konnte bereits Erben auffinden, indem er nach 70stündiger aseptischer Autolyse Albumosen und Peptone nachwies, die im frischen Blute fehlten. Auch gelang ihm die Darstellung dieses eiweißverdauenden Enzyms, indem er Plasmaleukocytengemisch mit Alkohol fällte und nach mehrmonatlichem Stehen den Alkoholniederschlag mit Glycerin extrahierte. Verdauungsversuche mit diesem Glycerinextrakt ergaben, daß er Fibrin in 3 proz. Sodalösung gut verdaute.

Schumm schloß ebenfalls aus seinen Untersuchungen bei der antiseptischen Autolyse von Leichenblut auf die Anwesenheit eines proteolytischen Fermentes im Blut bei der myelogenen Leukämie. Er hatte damals reichliche Mengen von Aminosäuren (Leucin, Tyrosin), ferner Zunahme des Ammoniaks und des durch Kochen und Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoffs nach der Autolyse nachweisen können. Auch er stellte aus dem Blut durch Fällen mit Alkohol und Extraktion mit Glycerin eine Fermentlösung her, die bei alkalischer Reaktion (nach Zusatz von Soda) Caseïn gut verdaute.

Da das Blut der lymphatischen Leukämie keine Peptonbildung bei der Autolyse aufwies, und normales Blut nach dreitägiger Autolyse bei 37° keine koagulierbaren Eiweißkörper enthielt, so nahm Erben an, das proteolytische Ferment sei gebunden an die polynukleären Leukocyten im Gegensatz zu den Lymphocyten und könne nur deshalb bei der myelogenen Leukämie zur Wirkung

kommen, weil hier die Zellen pathologisch verändert seien, so daß sie das Ferment nicht so fest zu binden vermöchten wie normale Leukocyten.

Diese Anschauung konnte der eine von uns (Jochmann) gemeinsam mit E. Müller als unrichtig erweisen. Es gelang auch mit isolierten normalen menschlichen Leukocyten genau dieselbe Verdauungswirkung zu erzielen, wie mit leukämischen Leukocyten, während Lymphocyten keinerlei proteolytische Eigenschaften hatten; (die Prüfungsmethode [Müller-Jochmann] bestand darin, daß die zu untersuchenden Proben auf die Oberfläche von erstarrten Serumplatten gebracht und 24 Stunden bei 55° gehalten wurden, wobei die Gegenwart von Ferment sich durch Dellenbildung infolge von Heterolyse bemerkbar machte). Es war also nunmehr festgestellt, daß die normalen polynukleären Leukocyten Träger eines stark wirksamen proteolytischen Fermentes sind. Bestätigt wurde diese Tatsache durch Erben, der bei 50° die Autolyse normalen menschlichen Blutes wiederholte und nun durch Ammonsulfat aussalzbare biurete Eiweißspaltungsprodukte, Albumosen, auffand und damit also die Autoproteolyse auch für normales Menschenblut feststellte. Auch Pfeiffer trug zur Bestätigung dieser Tatsache bei, indem er die Autolyse leukocytotischen Blutes untersuchte und durch den Nachweis unkoagulierbaren Stickstoffs fand, daß lediglich die Zahl, nicht eine supponierte pathologische Beschaffenheit der Leukocyten für den Ausfall des Autolyseversuches maßgebend ist.

Eine ganze Reihe von Arbeiten hat sich mit dem Nachweis des Leukocytenfermentes und des ebenfalls von Müller und Jochmann gefundenen Antifermentes in menschlichen Organen, Se- und Exkreten beschäftigt. Uns lag daran, um die Bedeutung des Fermentes für die menschliche Pathologie etwas genauer studieren zu können, eine möglichst reine Fermentlösung (und eventuell auch eine Lösung des Antifermentes) darzustellen. Beides gelang in relativ einfacher Weise, wenn auch natürlich von einer absoluten Reindarstellung, wie überhaupt bei Fermenten, so auch hier, nicht die Rede sein kann. Da nach den Untersuchungen von Jochmann und Müller beim Menschen, beim Affen und beim Hunde das Ferment außer in den Leukocyten des Blutes hauptsächlich im Eiter, im Knochenmark und in der Milz in großen Mengen enthalten ist, entsprechend dem Gehalt an polynukleären Leukocyten, so haben wir versucht, sowohl aus normalem menschlichem Knochenmark, wie auch aus Milz (normaler und leukämischer) und Eiter das Ferment zu gewinnen.

Das Knochenmark wurde durch Auspressen von menschlichen Rückenwirbeln am Schraubstock leicht gewonnen. An Eiter verwandten wir teils von Kokkenabszessen herstammenden, teils sterilen durch Terpentininjektion beim Menschen gewonnenen, an polynukleären Leukocyten reichen Eiter.

Darstellung des Fermentes.

Die von uns angewandte Methode führte erheblich schneller zum Ziel als das von Erben und Schumm benutzte Verfahren zur Gewinnung des Fermentes bei der Leukämie. Wir benutzen die uns von früheren Untersuchungen her bekannte Tatsache, daß hohe Temperaturen die Autolyse der fermenthaltigen Organe außerordentlich beschleunigen, so daß das Ferment nach Zugrundegehen der Leukocyten schnell frei wird. Das Ausgangsmaterial wurde deshalb stets erst 24 bis 48 Stunden der Autolyse im Brütschrank bei 55^0 ausgesetzt und hierauf in folgender Weise verarbeitet. Das betreffende Autolysat wurde zunächst mit der mehrfachen (ungefähr fünffachen) Menge eines Gemisches von zwei Teilen Alkohol und einem Teil Äther verrührt, um die fettartigen Stoffe herauszulösen, bzw. die eiweißartigen Verbindungen zu fällen. Nach eintägigem Stehen wurde filtriert, der Rückstand zunächst zur Verdunstung von Alkohol und Äther auf Ton ausgebreitet und dann mit einer entsprechenden Menge (bei flüssigem Ausgangsmaterial mit etwa $^1/_4$ Volumen) Glycerin und der gleichen Menge Wasser innig verrieben, nach ein- bis zweitägigem Stehen im Dunkeln wurde auf einem Büchnerschen Trichter abgesaugt und das klare Filtrat in die fünf- bis sechsfache Menge eines Alkoholäthergemisches (2:1) unter Umrühren allmählich eingegossen. Der dabei entstehende weißliche Niederschlag, welcher sich allmählich an dem Boden des Becherglases ziemlich fest ansetzt, wurde nach dem Abgießen der darüberstehenden Alkoholätherlösung auf Ton gebracht und im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Dabei färbt er sich gelbbraun und geht nur, besonders in dickeren Schichten, sehr allmählich in trockenen, zerreibbaren Zustand über. Das so gewonnene Produkt, welches das Enzym enthält, ist etwas hygroskopisch. Es löst sich beim Zerreiben mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung mit bräunlicher Farbe. Die Verdauungskraft des erhaltenen Präparates wurde nach verschiedenen Methoden geprüft.

Verdauungsproben.

Bringt man Tröpfchen der Lösung auf eine Löffler-Serum-Platte und setzt sie 24 Stunden einer Temperatur von 55^0 aus,

so entstehen an der Stelle der Tröpfchen tiefe Dellen als Ausdruck der eiweißlösenden Wirksamkeit des Fermentes.

Fibrinflöckchen werden durch die Fermentlösung gut verdaut, ebenso erstarrte Gelatine, Eiweißscheibchen sowie die erstarrten Sera der verschiedensten Tierarten (Rind, Hammel, Pferd, Hund, Kaninchen, Meerschweinchen).

Wir prüften die Fermentlösung weiterhin mit der für die Untersuchung proteolytischer Kräfte schon länger bekannten Caseïnprobe. Von dem getrockneten Enzym wurde 0,1 g in 5 ccm Wasser gelöst (= 2 Proz.) und mit 10 ccm gekochter Milch unter Zusatz von 0,1 g Soda und einigen Tropfen Chloroform im verschlossenen Reagenzrohr im Brütschrank bei 37° aufbewahrt. Ein Kontrollrohr war in der entsprechenden Weise, nur statt mit der Enzymlösung mit 5 ccm Wasser beschickt. Nach zweitägigem Stehen wurden beide Proben mit Essigsäure angesäuert, wobei die mit Enzym versetzte Lösung gleichmäßig trübe blieb, während die andere sogleich Caseïn abschied. Nach dem Aufkochen und Filtrieren wurde mit der Biuretreaktion geprüft. Dabei gab die Enzymprobe stark purpur-violette Färbung, die Kontrollprobe färbte sich nur schwach bläulich-violett.

Die Fermentlösung verdaute also Caseïn bei alkalischer Reaktion gut.

Von größter Wichtigkeit war uns der Ausfall einer weiteren Verdauungsprobe, die wir mit Peptonlösung anstellten. Schumm hatte diese Probe zur Prüfung des Trypsingehaltes von Pankreassäften empfohlen.

Die für diese Probe verwandte Peptonlösung wurde auf folgende Weise hergestellt: 25 g Witte-Pepton wurde in heißem Wasser gelöst, die Lösung nach dem Abkühlen mit normaler Salzsäure bis zur neutralen Reaktion (auf Lackmuspapier) versetzt (6 bis 7 ccm) und nach Hinzufügen von 1,5 g Soda mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt und filtriert.

Etwa 10 ccm dieser Lösung wurden mit einigen Cubikcentimetern der möglichst konzentrierten Enzymlösung vermischt, filtriert und unter Zusatz einiger Tropfen Chloroform im geschlossenen Glasgefäß bei 37° aufbewahrt. Die gleiche Menge Peptonlösung ohne Enzymzusatz, nur mit etwas Chloroform versetzt, kam zur Kontrolle in den Brütschrank. Nach mehrtägigem Stehen (fünf bis sechs Tage) zeigten sich in der mit Ferment versetzten Lösung kleine Knollen, welche sich unter dem Mikroskop als büschel- oder kugelförmige Konglomerate nadelförmiger Kristalle erwiesen, wie sie für Tyrosin charakteristisch sind.

Parallelproben mit Pankreatin ergaben (schon nach etwa einem Tage) genau dieselbe Erscheinung des Auftretens der charakteristischen Tyrosinknollen. Die zur Kontrolle in den Brütschrank gestellte Peptonlösung war unverändert geblieben. Auch die Erhitzungsprobe mit Millons Reagens gab positives Resultat (Rotfärbung).

Leucinkugeln konnten unter dem Mikroskop nicht beobachtet werden, jedoch ergab eine Probe der Lösung mit Kupfersulfat die charakteristische blaue Farbe, die auch beim Kochen beständig war.

Die Bildung von Tryptophan in der mit Enzym versetzten Peptonlösung konnte durch die bei Zusatz von Bromwasser entstehende rosarote Färbung konstatiert werden.

Außerdem wurde Ammoniak nachgewiesen. Einige Tropfen der mit Enzym behandelten Peptonlösung, mit Wasser verdünnt, gaben mit Nesslers Reagens deutlich gelbbraune Trübung.

Nach diesen Verdauungsproben muß eine außerordentlich weitgehende Ähnlichkeit in der Wirksamkeit des Leukocytenfermentes und des Pankreastrypsins konstatiert werden. Alle Spaltungsprodukte, die wir bei der Verdauung von Pepton durch Pankreatin erhielten, wurden auch durch das Leukocytenferment hervorgebracht. Wir sind daher der Anschauung, daß das Trypsin der Leukocyten dem Pankreastrypsin außerordentlich nahe verwandt, wenn nicht mit ihm identisch ist. Die sichere Feststellung der Identität wäre nur durch Verdauungsproben mit künstlichen Polypeptiden zu erreichen.

Resistenz gegen Erhitzen.

Außerdem wurde auch das Verhalten des Fermentes bei verschiedenen Hitzegraden untersucht. Während der eine von uns (Jochmann) schon früher mit Müller zusammen festgestellt hatte, daß das Ferment im Eiter zwischen 70 und 75⁰ Erhitzung zugrunde geht, ergab die Prüfung des trocken erhitzten Fermentpulvers, daß sich die Verdauungswirkung von 75⁰ an successive abschwächt, aber noch bei 95⁰ in Spuren erhalten war. Bei 100⁰ wurde jede Fermentwirkung zerstört.

Das trockene Ferment kam in gleichen Mengen auf Porzellanschalen und wurde $^1/_4$ Stunde im Trockenschrank erhitzt, danach wurde die Probe mit gleichen Mengen Kochsalzlösung aufgeschwemmt, auf die Serumplatte gebracht und bei 55⁰ 24 Stunden gehalten. Dabei zeigte sich bei

55° . . . starke Verdauung,
75° . . . etwas weniger gut,
85° . . . noch schwächer,
95° . . . Spuren,
100° . . . gar keine Verdauung.

Machten wir die Erhitzungsprobe mit Leukocytenferment in wässeriger Lösung, so ergaben sich folgende Resultate:

55° . . . starke Verdauung,
65° . . . „ „
70° . . . „ „
75° . . . keine „

Dieses Ergebnis stimmte also mit dem oben erwähnten überein, daß das Ferment im Eiter zwischen 70 und 75° Erhitzung zugrunde geht. Der Unterschied in der Resistenz gegenüber der Erhitzung zwischen der wässerigen Lösung und dem getrockneten Pulver entspricht den auch mit anderen Fermenten gemachten Erfahrungen. Insbesondere ist von dem Pankreastrypsin, das ja so weitgehende Ähnlichkeit mit dem Leukocytentrypsin hat, bekannt, daß es in wässeriger Lösung bei 70 bis 75° zugrunde geht und in trockenem Zustande höhere Erhitzung, sogar bis zu 160°, verträgt.

Der Einfluß verschiedener Reagenzien.

Die günstigste Reaktion für das Zustandekommen der eiweißverdauenden Wirksamkeit des Fermentes ist eine schwach alkalische, doch tritt auch bei schwach saurer Reaktion noch Dellenbildung auf. Auf stark sauren Serumplatten (bereitet mit Zusatz von mehreren Tropfen Eisessig) tritt keine Dellenbildung auf. Wir prüften den Einfluß verschiedener Reagenzien noch in folgender Weise: Einzelne Proben des getrockneten Enzyms wurden mit einigen Tropfen der zu prüfenden Flüssigkeit bis zur Lösung verrieben und tropfenweise auf Rinderserum- bzw. Löfflerplatten gebracht und einen Tag im Brutschrank bei 55° aufbewahrt. Jede Versuchsplatte wurde außerdem mit einigen Tropfen einer Vergleichslösung (Enzym in steriler physiologischer Kochsalzlösung) versehen. Das Ergebnis der Versuche war folgendes:

$^1/_{10}$ n-Salzsäure,
$^1/_1$ n-Oxalsäure,
$^1/_1$ n-Kalilauge,
$^1/_{10}$ „
10 Proz. Quecksilberchloridlösung hindern die Reaktion nicht.

Die Dellenbildung zeigte keinen merklichen Unterschied von derjenigen der Vergleichslösung. Verdünnte (25 proz.) Essigsäure

hindert stark. Eisessig ließ sich nicht verwenden, da das Enzym sich nicht darin löst.

Eine gesonderte Besprechung verlangt die Einwirkung des Formaldehyds auf das Ferment. In einer früheren Arbeit konnte Jochmann bereits zeigen, daß fermenthaltige menschliche Organe, wie z. B. leukämische Milz, bei der Aufbewahrung in 10 proz. Formalinlösung ihr Verdauungsvermögen nicht verlieren, sondern jahrelang behalten. Wir schlossen daraus auf eine außerordentlich starke Resistenz des Fermentes gegen Formalin. Auch Kokkeneiter, wenn man ihn mit gleichen Mengen reinen Formalins zusammenbringt, verliert seine verdauende Kraft nicht. Selbst der Zusatz der 40fachen Menge 10 proz. Formalins zu verdauendem Eiter verhindert nicht die Heterolyse des Serums beim Verdauungsversuche auf der Löfflerplatte. Dies war um so merkwürdiger, als Formaldehyd dafür gilt, schädlich auf Trypsin und insbesondere auf das Pankreastrypsin zu wirken.

Bei der Prüfung des reinen Fermentes gegenüber Formalin ergab sich ein von den übrigen Ergebnissen scheinbar etwas abweichendes Resultat. Löste man das trockene Ferment in 10 proz. Formalinlösung auf, und brachte Proben davon auf die Serumplatte bei 55°, so trat nur mäßige Dellenbildung ein, während die Kontrollprobe mit Kochsalzlösung stark verdaute.

Auch wenn man den Versuch in der Weise variiert, daß man das Enzym einen Tag lang unter Formalinlösung stehen läßt, dann abgießt, mit Wasser einige Male nachwäscht und dann in steriler, physiologischer Kochsalzlösung löst, so ist bei der Prüfung auf der Serumplatte die Dellenbildung geringer als bei der Kontrollprobe.

Es ergab sich also, daß das Formalin hemmende Wirkung auf die Verdauungskräfte des reinen Fermentes ausübte. In ähnlichem Sinne entschied folgendes Experiment: Nimmt man eine menschliche Milz, halbiert sie und bringt die eine Hälfte in einem verdeckten Becherglas in etwa 30 ccm physiologische Kochsalzlösung und die andere Hälfte in etwa ebensoviel 10 prozentiges Formalin und setzt beide Proben der Autolyse bei 55° aus, so ist nach 48 Stunden die in der Kochsalzlösung enthaltene Hälfte völlig verflüssigt, die in Formalin liegende Hälfte dagegen noch vollständig erhalten. Wurde nun aber ein Stückchen der mit Formalin behandelten Milz in fließendem Wasser ausgewaschen, und dann auf die Serumplatte gebracht, so trat Dellenbildung auf. Also das Ferment wurde in der Milz nicht abgetötet, es war nur in seiner Wirksamkeit gehemmt bzw. gar nicht zu einer Wirksamkeit ge-

kommen. Diese Verhältnisse sind offenbar so zu erklären, daß durch die Einwirkung des 10 proz. Formalins die fermenttragenden Zellen des Organs vor dem Zerfall geschützt und konserviert werden. Die Zellhülle wird gehärtet und es dringt das Formalin nicht in das Innere der Zellen ein. Das Ferment bleibt vielmehr unbeschädigt erhalten und kann in dem Moment wieder zur Wirksamkeit kommen, wenn das Formalin ausgewaschen wird und die fermentativen Kräfte nun ungehindert zur Wirkung kommen.

Resumieren wir also, so ist zu sagen, daß das Leukocytenferment dem Formalin gegenüber im Eiter und in eingelegten fermenthaltigen Organpräparaten eine auffallende Resistenz zeigt, während es in reiner Lösung eine Beeinträchtigung durch 10 proz. Formalin erfährt. Die Verhältnisse bei den zur Konservierung mit Formalin versetzten Präparaten erklären sich aus dem oben Gesagten. Für den Eiter ist anzunehmen, daß hier das Leukocytenferment, da es beim Zerfall der Leukocyten in statu nascendi wirken kann, noch kräftiger angreift als die auf chemischem Wege hergestellten Lösungen. Prüft man übrigens eine Reihe fallender Formalinverdünnungen des Eiters, so zeigt sich schließlich auch hier, d. h. bei stärkeren Verdünnungsgraden, daß eine mäßige Hemmung durch das Formalin im Vergleich zu den Kontrollwasserverdünnungen auftritt. Jedenfalls aber ist von der übermäßigen Schädlichkeit, die der Formaldehyd gegenüber Trypsin haben soll, beim Leukocytenferment nicht die Rede. Auch für das Pankreastrypsin konnten wir diese Angabe[1]) nicht bestätigen. Es verhält sich annähernd gleich dem Leukocytenferment. In starker Trypsinlösung zeigte es bei Formalinzusatz gute Verdauung, in schwacher mäßige Hemmung. Daß das Ferment gegenüber Sublimat und Alkohol (96 proz.) resistent ist, hatte Jochmann schon früher mit Ziegler zusammen bei der Untersuchung mit eingelegten menschlichen fermenthaltigen Organen zeigen können.

E. Müller und Kolatschek haben noch eine ganze Reihe chemischer Agenzien in ihrem Einfluß auf Eiter, nicht aber auf reine Fermentlösung geprüft. Sie fanden, daß Karbolsäure, Pikrinsäure, 10 proz. Essigsäure u. a. ebenfalls die proteolytische Wirksamkeit des Fermentes nur wenig beeinträchtigen.

Es geht also aus dem Gesagten hervor, daß das Leukocytenferment ein sehr widerstandsfähiger Körper ist, der den meisten Reagenzien gegenüber seine Verdauungsfähigkeit bewahrt.

---

[1]) Bliss u. Vovy, Journ. of exp. med. IV, 1899.

Anhangsweise sei noch ein Versuch hinzugefügt, das Antiferment darzustellen. Ganz analog der Herstellung des Leukocytenfermentes gelang dies durch Fällung mit Alkohol, Extrahieren mit Glycerin und nochmaliger Alkoholfällung.

Im genaueren war das Verfahren folgendes: 3 Liter Ödemflüssigkeit von einem Fall von Herzinsuffizienz wurden mit 5 Liter Alkohol gefällt. Es entstand dabei ein massiger weißer Niederschlag, der nach dem Filtrieren und Abdunsten mit 200 g Glycerin sorgfältig verrieben wurde. Nach zweitägigem Stehen gaben wir 200 g Wasser hinzu und filtrierten ab. Nun wurde nochmals mit Alkohol gefällt und der Niederschlag auf Tontellern getrocknet.

Das so gewonnene Präparat war ein grauweißes Pulver, das sich leicht in physiologischer Kochsalzlösung löste. Vermischte man diese Lösung tropfenweise auf dem Uhrschälchen mit Eiter zusammen und prüfte dann die verdauende Wirkung des Gemisches auf der Serumplatte, so machte sich die stark hemmende Wirkung des Antifermentes im Gegensatz zu den mit reiner Kochsalzlösung verdünnten Eiterproben bemerkbar. So z. B. verdaute ein geprüfter Testeiter, mit Kochsalzlösung verdünnt, 1:250, während derselbe Eiter, mit der Antifermentlösung verdünnt, nur noch in einer Verdünnung von 1:32 verdaute.

Prüfte man die gewonnene Antifermentlösung gegen Pankreatin (5 proz.), so machte sich auch hier eine analoge Hemmung der Verdauungswirkung geltend, ganz entsprechend der Annahme, daß das Antitrypsin gegen Leukocytenferment und das Antipankreastrypsin außerordentlich nahestehende, wenn nicht identische Körper sind.

Literatur.

Erben, Wien. klin. Wochenschrift 1902, S. 276.
„ Zeitschr. f. Heilkunde XXIV, 1903.
„ Hofmeisters Beiträge 5 (1904).
„ Münch. med. Wochenschrift Nr. 52, 1906.
„ Zentralblatt f. innere Mediz. Nr. 3, 1907.
Jochmann u. Müller, Münch. med. Wochenschrift Nr. 41, 1906.
Jochmann u. Ziegler, Ebenda Nr. 43, 1906.
Müller u. Jochmann, Ebenda Nr. 26, 1906.
Dieselben, Ebenda Nr. 31, 1906.
Dieselben, Verhandl. d. Kongresses f. innere Medizin. Wiesbaden 1907.
Müller u. Kolaczek, Münch. med. Wochenschrift Nr. 8, 1907.
Schumm, Hofmeisters Beiträge 4, Heft 9 bis 11.
Derselbe, Zeitschr. f. physiol. Chemie 36, 1902.

XXXV.

Über den osmotischen Druck des Nierenparenchyms.

(Zugleich ein Beitrag zur Frage der Funktion des Nierenmarkes.)

Von Dr. **Waichi Hirokawa** (Tokio).

(Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Prof. Dr. Otto v. Fürth im physiologischen Institut der Wiener Universität.)

I. Einleitung.

Während die Literatur über das Verhalten des osmotischen Druckes des Nierensekretes unter normalen und pathologischen Bedingungen zu einem kaum übersehbaren Umfange angewachsen ist, liegen über das osmotische Verhalten des Nierenparenchyms als solches nur ganz vereinzelte und höchst unvollständige Angaben vor, wie wir denn überhaupt über das physikalisch-chemische Verhalten der Organe selbst weit unvollkommener orientiert sind, als über dasjenige ihrer Säfte und Sekrete.

Bei der Beurteilung der vielfach beobachteten Tatsache, daß die Organe im allgemeinen einen höheren osmotischen Druck aufweisen als das Blut, wird man sicherlich stets die Tatsache im Auge behalten müssen, daß beim Absterben der Organzellen osmotisch aktive Moleküle neu entstehen können und daß der osmotische Gewebsdruck durch dieselben erhöht werde.

Trotzdem wird man aber, wie Höber[1]) in seinem vortrefflichen Buche über die physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe mit Recht hervorhebt, nicht wohl daran zweifeln dürfen, daß osmotische Druckdifferenzen zwischen dem Blute und den Organen auch bereits während des Lebens bestehen. „Tatsächlich gibt es“, sagt der genannte Autor, „ein sicheres Symptom dafür, daß zwischen den Organen und ihrem Milieu interne eine dauernde, während des ganzen Lebens nie ausgeglichene Druckdifferenz besteht; das ist ein konstanter, aus dem Blut in die arbeitenden Gewebe hinein gerichteter Wasserstrom.“

---

[1]) R. Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig 1902, S. 269.

Da nun die Niere gerade in bezug auf den letztgenannten Umstand vermöge ihrer Funktion eine Ausnahmestellung einnimmt, schien uns das Studium der osmotischen Druckverhältnisse des Nierenparenchyms ein besonderes physiologisches Interesse zu bieten, und es bedürfen unsere Bemühungen, die anatomisch differenzierbaren Teile des Nierengewebes (Rinde, Mark) in bezug auf ihr physikalisch-chemisches Verhalten miteinander zu vergleichen, wohl keiner weiteren Rechtfertigung.

Es sei uns zunächst gestattet, die in bezug auf diesen Gegenstand bisher vorliegenden spärlichen Literaturangaben in Kürze anzuführen.

Sabbatani[1]) unterwarf Blut und Organbrei von Hunden der direkten kryoskopischen Bestimmung:

Blut	Δ =	0,56	0,56	0,55	0,61	0,57
Nierenbrei	Δ =	0,83	0,85	0,96	0,93	0,75,

und brachte den Umstand, daß er den osmotischen Druck der Niere (zum Unterschied von der Mehrzahl der anderen Organe) stets viel höher fand als denjenigen des Blutes, mit der physiologischen Funktion dieses Organs in Beziehung.

Hamburger[2]) machte auf dem Wege volumetrischer Messung (mit Hilfe der Zentrifuge) einige Beobachtungen über die Quellung von Nierenzellen in hypisotonischen und über ihre Schrumpfung in hyperisotonischen Salzlösungen. So fand er, daß sich die Volumina einer Nierenparenchymsuspension in NaCl-Lösung von 0,6 und 1,5 Proz. wie 33 zu 25,5 verhielten.

Nun gestattet aber, wie Höber[3]) bemerkt, die Beobachtung des Volumens aus ihrem normalen Gewebsverbande herausgelöster Gewebszellen nicht ohne weiteres einen Rückschluß auf den in ihrem Innern im normalen Zustande herrschenden Druck, da bei der Isolierung eine Läsion der Plasmahäute und eine Verminderung der Semipermeabilität unvermeidlich sein dürfte.

Die Versuche von Demoor[4]), der auf plethysmographischem Wege die Volumänderungen der intakten Niere bei

[1]) L. Sabattani, Determination du point de congélation des organes animaux. Journ. de Physiol. et Pathol. 3, 939 (1901).

[2]) H. J. Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre 3, 52—54, Wiesbaden 1904.

[3]) l. c., S. 55.

[4]) J. Demoor, Rôle de la pression osmotique dans les fonctions du foie, des poumons et des reins. Bull. de l'Acad. roy. de Belgique. Dec. 1906. — Arch. internat. de Physiol. 4, 340 (1906). Vgl. auch Rôle de la pression osmotique dans les phénomènes de la vie. Bruxelles 1907.

Durchströmung mit hypo- und hypertonischen Salzlösungen beobachtete, können für die uns hier beschäftigende Frage nicht verwertet werden; schwillt doch z. B. eine Niere bei Einwirkung einer hypertonischen Salzlösung trotz Reduktion des Volumens der sezernierenden Zellen mächtig an, da große Flüssigkeitsmengen in den Gefäßen und den erweiterten Harnkanälchen zurückgehalten werden.

Am meisten Interesse für die vorliegende Frage boten einige Beobachtungen von Filehne und Biberfeld[1]), welche sich einer erst von Nasse, dann von J. Loeb[2]) bei Froschmuskeln angewandten Methode bedienten. Diese beruht darauf, daß gewogene Organstücke für einige Zeit in Salzlösungen von verschiedener Konzentration eingelegt werden. Die durch Wägung konstatierte Gewichtszu- und -abnahme gestattet bei entsprechender Interpolation die Feststellung jener Salzkonzentration, bei welcher das Organ weder Wasser aufnimmt, noch solches abgibt, und es gibt der osmotische Druck der betreffenden Salzlösung dann gleichzeitig auch den osmotischen Druck des zu prüfenden Organs an.

Filehne und Biberfeld stellten fest, daß eine durch Diuretin oder Chromsäure zu Diurese angeregte Niere aus physiologischer Kochsalzlösung weniger Wasser aufnimmt als eine normale Niere. Bei dieser Gelegenheit beobachteten sie auch, daß die Nierenrinde noch aus einer 1,2 bis 1,5 proz. NaCl-Lösung Wasser aufzunehmen vermöge und erst bei einer Konzentration von etwa 1,8 Proz. Wasser verliere; noch ausgesprochener war diese Fähigkeit, Wasser aus relativ hoch konzentrierten NaCl-Lösungen aufzunehmen, bei dem Nierenmark; in einem Versuche nahm es in einer 1,88 proz. Lösung fast 6 Proz. seines Anfangsgewichtes zu, in einer anderen etwa 2,5 proz. noch immer etwa 4 Proz.

II. Versuchsmethodik.

Unter den für eine systematische Untersuchung der osmotischen Verhältnisse des Nierenparenchyms in Betracht kommenden Methoden schien uns das von Filehne und Biberfeld angewendete Verfahren am geeignetsten zu sein. Wir haben uns daher für diese Methode entschieden, welche, wie wir im Verlaufe der Untersuchungen erfahren haben, zwar recht mühsam ist und ein

[1]) W. Filehne und H. Biberfeld, Beiträge zur Diurese. Pflügers Arch. 91, 568 (1902).

[2]) J. Loeb, Physiologische Untersuchungen über Ionenwirkung. Pflügers Arch. 69, 1 (1897).

peinlich sorgsames Arbeiten erfordert, dafür aber auch bei einiger Übung an Genauigkeit nichts zu wünschen übrig läßt.

Unsere Untersuchungen erstreckten sich auf die Nieren von Schweinen, Rindern, Katzen und Kaninchen. Auch das aus dem Schlachthause bezogene Material wurde in ganz frischem Zustande untersucht, der (s. u.) für das Gelingen der Versuche eine unerläßliche Bedingung bildet.

Die zur Untersuchung bestimmten Organstückchen wurden in Würfelform aus den frischen Nieren herausgeschnitten, vorsichtig mit Filtrierpapier von Blutresten befreit, sogleich in kleinen, gut eingeschliffenen Wägegläschen gewogen, sodann in die betreffende Kochsalzlösung von genau bekanntem Gehalte übertragen, nach einiger Zeit mit der Pinzette herausgenommen, auf Filtrierpapier von anhaftender Flüssigkeit befreit und neuerlich gewogen.

Das Herauspräparieren der Würfelchen aus den großen Schweine- und Rindernieren bot keine Schwierigkeiten. Mühsamer gestaltete sich der Versuch bei der Katzen- und Kaninchenniere, namentlich dort, wo es sich um den Vergleich von Mark und Rinde handelte. Dabei erwies es sich am zweckmäßigsten, den üblichen Sektionsschnitt zu vermeiden und zwei flache Schnitte parallel zu beiden Seiten der Medianebene der Niere zu führen. Aus dem so gewonnenen Mittelstück der Niere konnte man dann unschwer drei bis vier Markwürfelchen und ebensoviele Rindenwürfelchen herauspräparieren. Es ist wichtig, mit einem sehr scharfen, dünnen Messer zu arbeiten, da man sonst keine glatten Schnittflächen erzielt, das Gewebe quetscht und einen Teil des darin enthaltenen Gewebssaftes auspreßt.

Ein Beispiel mag die Versuchsanordnung veranschaulichen. (Hier wie bei allen späteren Versuchen bedeutet G das Gewicht des Nierenwürfels, $V(30')$ die Gewichtsveränderung, welche der Würfel nach 30 Minuten lang dauerndem Verweilen in der Salzlösung erfahren hat.)

Versuch 1. Rindsniere.

Na Cl	Rinde		Mark	
Proz.	G	$V(30')$	G	$V(30')$
1,4	0,2020	+ 0,0085	—	—
1,5	0,2290	+ 0,0083	—	—
1,6	0,2329	+ 0,0014	—	—
1,7	0,1905	+ 0,0060	0,2564	+ 0,0132
1,8	0,2009	— 0,0034	0,2728	+ 0,0022
1,9	0,1778	— 0,0022	0,2107	+ 0,0066
2,0	0,1915	— 0,0037	0,2426	+ 0,0046
2,5	—	—	0,2229	+ 0,0024
3,0	—	—	0,2369	+ 0,0013
4,0	—	—	0,2192	— 0,0036

Für die Rinde lag also die Konzentrationsgrenze, jenseits derer das Gewebe Wasser an die Salzlösung abgab und *V* sein Vorzeichen wechselte, bei 1,7 bis 1,8 Proz. NaCl, für die Marksubstanz aber erst bei 3 bis 4 Proz. NaCl. Der osmotische Druck der Nierenrinde entsprach also in diesem Falle einer 1,7 bis 1,8 proz. Kochsalzlösung, derjenige des Nierenmarks einer 3 bis 4 proz. Kochsalzlösung.

Von größter Wichtigkeit für die Methodik unserer Versuche war die Feststellung, wie lange die Salzlösung mit dem Nierengewebe in Kontakt bleiben kann, ohne daß eine durch postmortale Veränderungen bewirkte tiefgreifende Alteration der physikalisch-chemischen Verhältnisse zu besorgen ist.

Wie bereits aus den von Loeb[1]) und Overton[2]) an Froschmuskeln gemachten Beobachtungen hervorgeht, verändern nämlich Organe einige Zeit nach dem Tode ihr osmotisches Verhalten derart, daß sie selbst aus stark hyperosmotischen Lösungen (z. B. aus einer 5 proz. NaCl-Lösung) Wasser aufnehmen.

Analoges vermochten wir auch hinsichtlich des osmotischen Verhaltens des Nierenparenchyms festzustellen.

Versuch 2.

Frische Schweinsnierenrinde. Zur Verhütung der Fäulnis wurde den Salzlösungen, welche mit den aus der Rinde herauspräparierten Würfelchen in Berührung kamen, ein Tropfen Toluol zugesetzt.

NaCl Proz.	*G*	*V* (3 Stunden)	*V* (18 Stunden)
0,8	0,2284	+ 0,0414	+ 0,0654
1,2	0,3613	+ 0,0285	+ 0,0764
1,6	0,2578	+ 0,0033	+ 0,0403
1,8	0,2961	+ 0,0071	+ 0,0436
2,0	0,2915	— 0,0112	+ 0,0264
2,4	0,3371	— 0,0060	+ 0,0966
2,8	0,3277	— 0,0200	+ 0,0485
3,2	0,3422	— 0,0134	+ 0,0551
3,6	0,2582	— 0,0134	+ 0,0191
4,0	0,2331	— 0,0132	+ 0,0356

[1]) l. c.

[2]) E. Overton, Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. Pflügers Arch. **92**, 115 (1902).

Während also der osmotische Druck der frischen Schweinsnierenrinde einer 1,8 bis 2,0 proz. NaCl-Lösung entsprach, vermochte dasselbe Organ nach 18 Stunden noch aus einer 4 proz. NaCl-Lösung Wasser aufzunehmen, erwies sich also einer solchen gegenüber „hyperosmotisch“.

Noch eklatanter trat dieses Verhalten in folgendem Versuche zutage.

Versuch 3. Schweinsniere.

NaCl Proz.	G	V (23 Std.)	NaCl Proz.	G	V (23 Std.)
1	0,2896	+ 0,0841	6	0,2489	+ 0,0658
2	0,2825	+ 0,0660	7	0,2429	+ 0,0668
3	0,2921	+ 0,0725	8	0,2663	+ 0,0644
4	0,2912	+ 0,0755	9	0,2238	+ 0,0565
5	0,2036	+ 0,0500	10	0,2517	+ 0,0611

Hier hatte also die Schweinsnierenrinde nach 23 Stunden ihr natürliches osmotisches Verhalten so sehr geändert, daß sie selbst aus einer 10 proz. NaCl-Lösung noch Wasser aufnahm; ein Grenzwert war selbst bei dieser exorbitanten Salzkonzentration demnach nicht erreicht worden.

Auch die Katzenniere verhält sich ganz analog. Wie aus den nachstehenden Versuchen hervorgeht, zeigte die Rinde derselben noch nach $2^1/_2$ Stunden ein durchaus normales osmotisches Verhalten, während nach 4 Stunden sich die postmortalen Veränderungen bereits in Form eines exorbitanten Ansteigens des Wasserattraktionsvermögens geltend machten.

Versuch 4. Katzennierenrinde.

NaCl Proz.	G	V (1 Stunde)	V ($2^1/_2$ Stunden)
1	0,1954	+ 0,0488	+ 0,0564
1,5	0,2125	+ 0,0355	+ 0,0548
2,0	0,2067	— 0,0151	— 0,0333
2,5	0,2126	— 0,0617	— 0,0267
3,0	0,1595	— 0,0047	— 0,0040
3,5	0,2054	— 0,0110	— 0,0107

Versuch 5. Katzennierenrinde.

Na Cl Proz.	G	V (1 Stunde)	V (4 Stunden)
1	0,1965	+ 0,0705	+ 0,0813
1,5	0,2181	+ 0,0529	+ 0,0646
2,0	0,2353	— 0,0051	+ 0,0082
3,0	0,2163	— 0,0094	+ 0,0028
3,5	0,2308	— 0,0066	+ 0,0021

Es fragt sich nunmehr, wie diese außerordentlich auffallende postmortale Veränderung des physikalisch-chemischen Verhaltens der Organe gedeutet werden könne. Overton[1]) hat Loeb gegenüber (der die hydrolytische Spaltung komplexer Organbestandteile durch die postmortal entstandene Säure für diese Erscheinung verantwortlich machte) auf die veränderten Durchlässigkeitsverhältnisse der abgestorbenen Zellen hingewiesen.

„Loeb denkt sich den Mechanismus der Erscheinung so", sagt Overton, „daß die H-Ionen der Säure eine Spaltung von komplizierten Verbindungen in dem Muskel bewirken, wodurch die gesamte molekulare Konzentration und damit auch der osmotische Druck des Muskels erhöht wird. Er gibt an, daß (Frosch)-Gastrocnemii nach einiger Zeit selbst in 4,9 proz. NaCl-Lösungen an Gewicht zunehmen. Schon diese Tatsache genügt, um die Unhaltbarkeit von Loebs Erklärung darzutun. Denn selbst wenn das gesamte Glykogen des Muskels in Traubenzucker und alle Proteïnverbindungen desselben vollständig in Amidosäuren und Hexonbasen zerfallen würden, bliebe der gesamte osmotische Druck dieser Verbindung hinter dem von NaCl 5 Proz. zurück." Und weiter oben: „Die Erscheinung, daß Muskeln in stärker hyperisotonischen Kochsalzlösungen nach einer anfänglichen Gewichtsabnahme später, nachdem der Muskel abgestorben ist, wieder an Gewicht zunehmen, erklärt sich leicht daraus, daß die abgestorbenen Muskelfasern früher bzw. leichter für NaCl, als für Na_2HPO_4 und die übrigen im Innern der Muskelfasern befindlichen gelösten Stoffe permeabel werden ... Übrigens ist es nicht unwahrscheinlich, daß durch die Säurebildung des absterbenden Muskels das Quellungsvermögen der Muskelfasern mehr oder weniger erhöht und die Menge des Quellungswassers daher vermehrt werde. Doch wird dies nur eine geringe Rolle spielen."

Ohne auf diese Frage, welche Prof. v. Fürth zum Gegenstand genauerer Untersuchungen zu machen beabsichtigt, genauer einzugehen, sei hier darauf hingewiesen, daß, wie K. Spiro[2]) gefunden hat, bereits minimale Säuremengen die Quellung

[1]) l. c., S. 155 bis 156.

[2]) K. Spiro, Über Lösung und Quellung von Kolloiden. Aus dem physiol.-chem. Institut der Univers. Straßburg. Hofm. Beitr. 5, 277 (1904).

von Leimplatten außerordentlich stark beeinflussen können. So betrug in seinen Versuchen die Wasseraufnahme, je einem Teil Leim entsprechend, bei der Quellung in reinem Wasser: 1,97 Tle., in $^{1}/_{200}$ n-HCl 5,45 Tle., in $^{1}/_{500}$ n-HCl 3,49 Tle. Wasser.

Es erscheint uns daher als sehr wahrscheinlich, daß die postmortal entstehende Säure den Quellungszustand der Gewebe in sehr mächtiger Weise beeinflußt und sie befähigt, weit größere Wassermengen in sich aufzunehmen, als dem normalen vitalen Zustande adäquat sind.

Wenn also z. B. ein Nierenrindenstück 23 Stunden post mortem selbst aus einer 10 proz. NaCl-Lösung noch Wasser zu schöpfen vermochte, so war es eben allem Anschein nach keine osmotische Druckkraft, welche diese Wasserbewegung auslöste, sondern eine einer weit höheren Größenordnung angehörige Kraft, nämlich die Quellkraft. Daß diese befähigt war, den osmotischen Druck selbst einer 10 proz. NaCl-Lösung zu überwinden, ist leicht verständlich.

Jedenfalls aber mußten wir diese Fehlerquelle bei unseren Versuchen unter allen Umständen vermeiden. Es geschah dies in der Weise, daß wir (unter Verzicht auf die durch eine längere Versuchsdauer etwa erzielbaren größeren Gewichtsdifferenzen der einzelnen Proben) die Dauer der Einwirkung der Salzlösungen auf die ganz frischen Gewebsstücke in der Regel auf eine halbe Stunde einschränkten. Der Zusatz eines Antiseptikums wurde unter diesen Umständen selbstverständlich überflüssig.

III. Versuche.

A. Schweinsniere.

Versuch 6. Nierenrinde.

NaCl Proz.	G	V (½ Stunde)
1,1	0,3007	+ 0,0447
1,2	0,3989	+ 0,0438
1,3	0,3610	+ 0,0350
1,4	0,3746	+ 0,0498
1,5	0,4073	+ 0,0377
1,6	0,4886	+ 0,0259
1,7	0,2590	+ 0,0158
1,8	0,2800	— 0,0195

Demnach: der osmotische Druck der Nierenrinde 0 = 1,7 bis 1,8 Proz. NaCl.

Versuch 7. Nierenrinde.

NaCl Proz.	G	V (3 Std.)	NaCl Proz.	G	V (3 Std.)
0,8	0,3210	+ 0,0610	2,8	0,3143	— 0,0110
1,2	0,3980	+ 0,0328	3,2	0,4100	— 0,0400
1,6	0,3142	+ 0,0083	3,6	0,3131	— 0,0160
2,0	0,3466	— 0,0022	4,0	0,3350	— 0,0358
2,4	0,3636	— 0,0148			

0 = 1,6 bis 2,0 Proz. NaCl.

Versuch 8. Nierenrinde.

NaCl Proz.	G	V (3 Std.)	NaCl Proz.	G	V (3 Std.)
1,6	0,2575	+ 0,0065	2,0	0,2925	— 0,0017
1,8	0,1990	— 0,0020	2,4	0,3398	— 0,0100

0 = 1,6 bis 1,8 Proz. NaCl.

Versuch 9. Nierenrinde.

NaCl Proz.	G	V (3 Std.)	NaCl Proz.	G	V (3 Std.)
0,8	0,2284	+ 0,0414	2,4	0,3371	— 0,0060
1,2	0,3613	+ 0,0285	2,8	0,3277	— 0,0200
1,6	0,2578	+ 0,0033	3,2	0,3422	— 0,0134
1,8	0,2961	+ 0,0071	3,6	0,2582	— 0,0134
2,0	0,2915	— 0,0112	4,0	0,2731	— 0,0132

0 = 1,8 bis 2,0 Proz. NaCl.

Versuch 10. Nierenrinde.

NaCl Proz.	G	V (1 Std.)	NaCl Proz.	G	V (1 Std.)
1,5	0,3041	+ 0,0030	3,0	0,2978	— 0,0231
2,0	0,3423	— 0,0114	3,5	0,2217	— 0,0224
2,5	0,2963	— 0,0195	4,0	0,2725	— 0,0288

0 = 1,5 bis 2,0 Proz. NaCl.

Die Versuche 5 bis 10, ebenso wie die Versuche 1 und 2 ergeben sonach in vollkommener Übereinstimmung, daß der osmotische Druck der Schweinsnierenrinde demjenigen einer 1,5 bis 2 proz. NaCl-Lösung entspricht.

B. Rindsniere.

Versuch 11.

NaCl	Rinde			Mark	
Proz.	*G*	*V* (1/2 Std.)	*V* (1 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,4	0,2020	+ 0,0085	+ 0,0070	—	—
1,5	0,2290	+ 0,0083	+ 0,0135	—	—
1,6	0,2329	+ 0,0014	+ 0,0022	—	—
1,7	0,1905	+ 0,0060	+ 0,0040	0,2564	+ 0,0132
1,8	0,2009	— 0,0034	— 0,0069	0,2728	+ 0,0022
1,9	0,1777	— 0,0022	— 0,0008	0,2107	+ 0,0062
2,0	0,1915	— 0,0037	— 0,0042	0,2426	+ 0,0042
2,5	—	—	—	0,2229	+ 0,0204
3,0	—	—	—	0,2369	+ 0,0013
4,0	—	—	—	0,2192	— 0,0036

Demnach entsprach der osmotische Druck der Nierenrinde auch hier wiederum demjenigen einer 1,7 bis 1,8 proz. NaCl-Lösung; derjenige der Marksubstanz lag dagegen wesentlich höher: 0 = 3,0 bis 4,0 Proz. NaCl.

C. Kaninchenniere.

Versuch 12.

NaCl	Rinde		Mark	
Proz.	*G*	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,1334	+ 0,0104	—	—
1,5	0,1506	+ 0,0014	0,1105	+ 0,0079
2,0	0,1717	— 0,0049	0,0889	+ 0,0075
3,0	—	—	0,0798	+ 0,0012
4,0	—	—	0,0807	— 0,0032

Rinde . . . . 0 = 1,5 bis 2,0 Proz. NaCl,
Mark . . . . 0 = 3,0 bis 4,0 Proz. NaCl.

Versuch 13.

Na Cl Proz.	Rinde		Mark	
	G	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,1876	+ 0,0027	—	—
1,5	0,1933	— 0,0131	0,1028	+ 0,0023
2,0	0,1799	— 0,0213	0,1311	— 0,0054
3,0	—	—	0,1022	— 0,0125
4,0	—	—	0,1683	— 0,0230
5,0	—	—	0,1157	— 0,0165

Rinde . . . . . . 0 = 1,0 bis 1,5 Proz. Na Cl,
Mark . . . . . . 0 = 1,5 bis 2,0 Proz. Na Cl.

Versuch 14.

Na Cl Proz.	Rinde		Mark	
	G	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,1179	+ 0,0082	—	—
1,5	0,1400	— 0,0085	0,0754	+ 0,0091
2,0	0,1175	— 0,0135	0,0629	+ 0,0005
3,0	—	—	0,1055	— 0,0168
4,0	—	—	0,1249	— 0,0207

Rinde . . . . . . 0 = 1,0 bis 1,5 Proz. Na Cl,
Mark . . . . . . 0 = 2,0 bis 3,0 Proz. Na Cl.

Versuch 15.

Bei einem Kaninchen wurde nach Eingießung von 120 ccm Wasser per Schlundsonde und Anlegung einer Blasenfistel durch subcutane Injektion von 0,04 g Coffeïnum natrobenzoicum eine nicht sehr hochgradige Diurese erzielt. Die Gefrierpunktsbestimmung in den beiden zuletzt aufgefangenen Harnportionen ergab $\Delta = 0{,}78^0$ bzw. $1{,}05^0$, was dem osmotischen Druck einer 1 bis 1,5 proz. Kochsalzlösung entspricht.

Na Cl Proz.	Rinde		Mark	
	G	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,1971	+ 0,0095	0,0876	+ 0,0060
1,5	0,1288	— 0,0044	0,0961	0
2,0	0,1701	— 0,0146	0,0760	— 0,0062

Rinde . . . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. Na Cl,
Mark . . . . . . 0 = 1,5 Proz. Na Cl,
Harn . . . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. Na Cl.

Der gefundene osmotische Druck der Nierenrinde des Kaninchens entspricht sonach demjenigen einer 1 bis 2 proz. Kochsalzlösung. Derjenige des Nierenmarkes kann wesentlich höhere Werte erreichen; bei jenem Versuch eben, wo durch Coffeïndiurese ein dünner Harn erzielt worden war, lag auch der osmotische Druck des Nierenmarkes innerhalb der genannten Grenzen.

D. Katzenniere.

Versuch 16. Rinde.

Na Cl Proz.	G	V (1 Std.)	Na Cl Proz.	G	V (1 Std.)
1,0	0,1994	+ 0,0488	2,0	0,2126	— 0,0317
1,5	0,2125	+ 0,0335	2,3	0,1595	— 0,0047
1,8	0,2067	— 0,0151	2,5	0,2054	— 0,0110

Rinde . . . . . . 0 = 1,5 bis 1,8 Proz. Na Cl.

Versuch 17.

Na Cl	Rinde		Mark	
Proz.	G	V (1/2 Std.)	G	V (1/2 Std.)
1,0	0,1965	+ 0,0705	0,1960	+ 0,0392
1,5	0,2181	+ 0,0529	0,1689	+ 0,0329
2,0	0,2353	— 0,0051	0,1945	+ 0,0192
3,0	0,2163	— 0,0097	0,1860	+ 0,0290
4,0	0,2303	— 0,0066	0,1842	+ 0,0208

Rinde . . . . . . 0 = 1,5 bis 2,0 Proz. Na Cl,
Mark . . . . . . 0 > 4 Proz. Na Cl.

Versuch 18.

Na Cl	Rinde		Mark	
Proz.	G	V (1/2 Std.)	G	V (1/2 Std.)
1,0	0,4768	+ 0,0573	—	—
1,5	0,3771	+ 0,0113	0,2917	+ 0,0200
2,0	0,4125	— 0,0191	0,2635	+ 0,0140
2,5	—	—	0,2569	+ 0,0075
3,0	—	—	0,2540	— 0,0083

Rinde . . . . . . 0 = 1,5 bis 2,0 Proz. Na Cl,
Mark . . . . . . 0 = 2,5 bis 3,0 Proz. Na Cl.

Versuch 19.

NaCl Proz.	Rinde		Mark	
	G	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,3889	+ 0,0360	—	—
1,5	0,4652	— 0,0088	—	—
2,0	0,1759	— 0,0071	—	—
4,0	—	—	0,0811	+ 0,0080
7,0	—	—	0,0648	0
10,0	—	—	0,0442	— 0,0016

Der der Blase entnommene Harn zeigte nach vierfacher Verdünnung eine Gefrierpunktserniedrigung $\Delta/4 = 1{,}15^0$; der osmotische Druck des unverdünnten Harnes entsprach demnach demjenigen einer etwa 7 proz. NaCl-Lösung (Kontrollversuch: NaCl 7 proz. ergab $\Delta = -4{,}64^0$).

Rinde . . . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. NaCl,
Mark . . . . . . 0 = 7 Proz. NaCl,
Harn . . . . . . 0 = 7 Proz. NaCl.

Versuch 20.

NaCl Proz.	Rinde		Mark	
	G	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,3023	+ 0,0130	—	—
1,5	0,2500	— 0,0120	0,0887	+ 0,0061
2,0	0,2438	— 0,0261	0,0960	+ 0,0080
3,0	0,2676	— 0,0460	—	—
4,0	0,2765	— 0,0623	0,0355	+ 0,0070
8,0	—	—	0,0610	— 0,0025
10,0	—	—	0,0374	— 0,0039

Der Blasenharn erwies sich in diesem Falle äußerst konzentriert und gab noch nach zehnfacher Verdünnung eine Gefrierpunktserniedrigung $\Delta/10 = -0{,}68^0$. Der osmotische Druck des unverdünnten Harnes entsprach demnach etwa demjenigen einer 10 proz. NaCl-Lösung.

Rinde . . . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. NaCl,
Mark . . . . . . 0 > 4 Proz. NaCl[1]),
Harn . . . . . . 0 = etwa 10 Proz. NaCl.

[1]) Der niedrigste von Dreser beobachtete Gefrierpunkt des Katzenharnes betrug 4,64° (vgl. Overton in Nagels Handb. d. Physiol. 2, 885).

Versuch 21.

Na Cl Proz.	Rinde		Mark	
	G	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,2900	+ 0,0190	—	—
1,5	0,2588	— 0,0020	0,1412	+ 0,0060
2,0	0,2470	— 0,0125	0,1742	+ 0,0103
3,0	0,2990	— 0,0090	—	—
4,0	0,2129	— 0,0280	0,1885	— 0,0040
6,0	—	—	0,1820	— 0,0015
7,0	—	—	0,1532	— 0,0163
8,0	—	—	0,0855	— 0,0115

Harn: Δ = — 2,30°, entsprechend einer 4 proz. NaCl-Lösung (Kontrollversuch mit 4 proz. ClNa-Lösung: Δ = — 2,39).

Rinde . . . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. NaCl,
Mark . . . . . . 0 = 2 bis 4 Proz. NaCl,
Harn . . . . . . 0 = 4 Proz. NaCl.

Versuch 22.

Na Cl Proz.	Rinde		Mark	
	G	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,2265	+ 0,0040	—	—
1,5	0,2000	— 0,0135	0,0955	+ 0,0050
2,0	0,2332	— 0,0235	0,0690	+ 0,0057
4,0	—	—	0,0696	+ 0,0029
8,0	—	—	0,0500	— 0,0055

Blasenharn: Δ = — 3,96, entsprechend einer etwa 6 proz. NaCl-Lösung.

Rinde . . . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. NaCl,
Mark . . . . . . 0 > 4 Proz. NaCl,
Harn . . . . . . 0 = 6 Proz. NaCl.

Versuch 23.

Na Cl Proz.	Rinde		Mark	
	G	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,2673	+ 0,0350	—	—
1,5	0,2597	— 0,0005	—	—
2,0	0,2745	— 0,0140	—	—
3,0	—	—	0,1815	+ 0,0123
7,0	—	—	0,1374	+ 0,0081

Blasenharn vierfach verdünnt $\Delta/4 = -1{,}30^0$. Der osmotische Druck des unverdünnten Harnes entspricht demnach etwa demjenigen einer 8 bis 9 proz. NaCl-Lösung.

Rinde . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. NaCl,
Mark . . . . 0 > 7 Proz. NaCl,
Harn . . . . 0 = 8 bis 9 Proz. NaCl.

Versuch 24.

Durch Eingießen von 100 ccm Wasser per Schlundsonde (Urethannarkose) wurde die Ausscheidung eines verdünnten Harnes hervorgerufen. Eine Stunde später wurde die Katze getötet.

NaCl	Rinde		Mark	
Proz.	*G*	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,1120	+ 0,0055	—	—
1,5	0,1846	— 0,0089	0,0937	— 0,0030
2,0	0,1360	— 0,0193	0,0648	— 0,0003
3,0	0,1395	— 0,0278	0,0810	— 0,0028
4,0	—	—	0,0453	— 0,0025

Harn (unverdünnt): $\Delta = -1{,}45^0$.

Rinde . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. NaCl,
Mark . . . . 0 < 1,5 Proz. NaCl,
Harn . . . . 0 = 2 Proz. NaCl.

Versuch 25.

Intravenöse Infusion von 1 proz. NaCl-Lösung. Harn aus Blasenkanüle aufgefangen (Urethannarkose). Letzte Harnportion $\Delta = -1{,}68^0$.

NaCl	Rinde		Mark	
Proz.	*G*	*V* (1/2 Std.)	*G*	*V* (1/2 Std.)
1,0	0,1720	+ 0,0102	0,0883	+ 0,0113
1,5	0,2221	— 0,0046	0,0685	+ 0,0053
2,0	0,1818	— 0,0193	0,0910	+ 0,0070
4,0	—	—	0,0555	— 0,0001

Rinde . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. NaCl,
Mark . . . . 0 = 4 Proz. NaCl,
Harn . . . . 0 = 3 Proz. NaCl.

Versuch 26.

Chloralhydrat. Harnverdünnung durch Infusion von 100 ccm Wasser per Schlundsonde.

NaCl Proz.	Rinde		Mark	
	G	V (½ Std.)	G	V (½ Std.)
1,0	0,2444	— 0,0028	—	—
1,5	0,2699	— 0,0249	—	—
2,0	0,2869	— 0,0397	0,1984	+ 0,0050
2,5	—	—	0,1152	— 0,0155
3,0	—	—	0,1728	— 0,0155
4,0	—	—	0,1234	— 0,0185

Rinde . . . . 0 < 1 Proz. NaCl,
Mark . . . . 0 = 2 bis 2,5 Proz. NaCl.

Versuch 27.

Äthernarkose. Harnverdünnung durch Infusion von 100 ccm Wasser per Schlundsonde und subcutane Injektion von Coffeïnum natrobenzoicum 0,05 g.

NaCl Proz.	Rinde		Mark	
	G	V (½ Std.)	G	V (½ Std.)
1,0	0,3030	+ 0,0032	0,1438	+ 0,0058
1,5	0,2478	— 0,0135	0,1187	— 0,0041
2,0	0,3104	— 0,0325	0,1038	— 0,0142

Rinde . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. NaCl,
Mark . . . . 0 = 1 bis 1,5 Proz. NaCl.

Der osmotische Druck der Katzennierenrinde ist also ein außerordentlich konstanter und zwar entspricht er demjenigen einer 1 bis 2 proz. Kochsalzlösung. Der osmotische Druck der Marksubstanz ist dagegen unter normalen Verhältnissen stets erheblich höher und übersteigt häufig denjenigen einer 4 proz. Kochsalzlösung; er ist um so höher, in je konzentrierterer Form der Harn ausgeschieden wird, und gelingt es, denselben durch künstliche Harnverdünnung (durch Flüssigkeitsinfusion) auf ein niedriges Niveau herabzudrücken.

IV. Physiologische Ergebnisse.

Um nun die physiologischen Schlußfolgerungen aus unseren Versuchen abzuleiten, mögen zunächst die objektiven Resultate derselben in einer Tabelle in übersichtlicher Form zur Anschauung gebracht werden.

Die in derselben enthaltenen Zahlenwerte beziehen sich auf den osmotischen Druck (0) der Nierenrinde, des Nierenmarkes

und des Harnes, ausgedrückt durch die prozentische Konzentration einer dem betreffenden Gewebe bzw. Sekret isosmotischen Kochsalzlösung.

Nr. des Versuchs	Tiergattung	Nierenrinde	Nierenmark	Harn	Anmerkung
1	Schwein	1,7—1,8	—	—	
2	„	1,8—2,0	—	—	
6	„	1,7—1,8	—	—	
7	„	1,6—2,0	—	—	
8	„	1,6—1,8	—	—	
9	„	1,8—2,0	—	—	
10	„	1,5—2,0	—	—	
11	Rind	1,7—1,8	3—4	—	
12	Kaninchen	1,5—2,0	3—4	—	
13	„	1,0—1,5	1,5—2,0	—	
14	„	1,0—1,5	2—3	—	
15	„	1,0—1,5	1,5	1—1,5	Wasserinfusion, Coffeïndiurese
4	Katze	1,5—2,0	—	—	
5	„	1,5—2,0	—	—	
16	„	1,5—1,8	—	—	
17	„	1,5—2,0	> 4	—	
18	„	1,5—2,0	2,5—3,0	—	
19	„	1,0—1,5	7	7	
20	„	1,0—1,5	> 4	10	
21	„	1,0—1,5	2—4	4	
22	„	1,0—1,5	> 4	6	
23	„	1,0—1,5	> 7	8—9	
24	„	1,0—1,5	< 1,5	2	Diurese nach Wasserinfusion
25	„	1,0—1,5	4	3	Intravenöse Infusion von 1 Proz. NaCl
26	„	< 1,0	2,0—2,5	—	Wasserinfusion in den Magen
27	„	1,0—1,5	1,0—1,5	—	Wasserinfusion in den Magen und Coffeïn

Ein Blick auf vorstehende Tabelle lehrt folgendes:

Der osmotische Druck der Nierenrinde aller untersuchten Tierarten (Schwein, Rind, Kaninchen, Katze) ist ein außerordentlich konstanter und entspricht demjenigen einer 1 bis 2 proz. Kochsalzlösung. Er ist unabhängig von der Konzentration des ausgeschiedenen Harnes und erreicht selbst dann keinen höheren Wert, wenn der osmotische Druck des Nierensekretes sich bis zu demjenigen einer 5 bis 10 proz. NaCl-Lösung erhebt.

Der osmotische Druck des Nierenmarkes dagegen ist außerordentlich wechselnd und unter normalen Verhältnissen fast

ausnahmslos wesentlich höher als derjenige der Rinde, und zwar ist er um so höher, ein je konzentrierterer Harn ausgeschieden wird.

Erzielt man dagegen durch Infusion von Wasser oder einer schwachen Salzlösung die Sekretion eines stark verdünnten Harnes, so gelingt es unschwer, den osmotischen Druck des Nierenmarkes bis auf das Niveau desjenigen der Rinde herabzudrücken.

Es ergibt sich daraus die Schlußfolgerung, daß der hohe osmotische Druck des Nierenmarkes nicht etwa den sezernierenden Zellen als solchen, vielmehr dem in den Harnkanälchen enthaltenen Harne eigentümlich ist.

Es liegt also gar kein Grund für die Annahme vor, daß die Nierenzellen, ihrer physiologischen Rolle und Bestimmung entsprechend, etwa vermöge einer hohen osmotischen Druckkraft befähigt seien, einen Wasserstrom aus dem Blute in ihr Protoplasma zu lenken. Osmotische Druckkräfte vermögen die spezifische Wasseraufnahme durch die Zellen des Nierenparenchyms sicherlich ebensowenig zu erklären, wie ihr Vermögen, das aus dem Blute geschöpfte Wasser gegen das Lumen der Harnkanälchen hin zu eliminieren.

Unsere Versuche gestatten jedoch noch eine weitere Schlußfolgerung, und zwar bezieht sich dieselbe auf die physiologische Leistung und Bedeutung des Nierenmarkes.

Unsere Beobachtungen lehren in eindeutiger Weise, daß der Harn, welcher in der Marksubstanz enthalten ist, einen weit höheren osmotischen Druck besitzt, als jener Harn, welcher die gewundenen Kanäle der Nierenrinde erfüllt; der osmotische Druck des Harnes nimmt also, während dieser die Henleschen Schleifen und die Sammelröhren passiert, sehr erheblich zu. Solange der Harn in den Rindenkanälchen verweilt, steigt seine molekulare Konzentration bei keiner der beobachteten Tiergattungen über den $1^1/_2$ bis 2fachen Wert jener molekularen Konzentration an, welche dem Blute eigentümlich ist. Einen hohen osmotischen Druck, der bis zu einem Vielfachen des Blutwertes sich erheben kann, erlangt der Harn offenbar erst, nachdem er die gewundenen Kanälchen verlassen hat, also auf seinem Wege durch das Nierenmark.

Eine Erhöhung des osmotischen Druckes des Harnes im Nierenmark kann nun offenbar auf zweifachem Wege zustande kommen: entweder durch sekretorische Anreicherung des Harnes an

osmotisch wirksamen Bestandteilen, oder aber durch Wasserverarmung infolge Rückresorption.

Es fragt sich nun, welche von diesen beiden Möglichkeiten eine größere Wahrscheinlichkeit besitzt.

Falls die erstgenannte Eventualität die ausschließlich zutreffende wäre, müßte die Hauptleistung hinsichtlich der sekretorischen Überführung des Harnstoffes und der anorganischen Harnbestandteile aus dem Blute nicht, wie dies im Sinne der Bowmann-Heidenhainschen Anschauung von der Mehrzahl der Physiologen angenommen wird, von den gewundenen Kanälchen der Rinde, sondern von den Henleschen Schleifen und den Sammelröhren des Muskels besorgt werden. Denn nur so könnten Beobachtungen, wie z. B. die Versuche 19 und 23, erklärt werden, wo der osmotische Druck der Nierenrinde 1 bis 1,5 Proz. NaCl, derjenige im Mark aber 7 Proz. NaCl bzw. einem noch höheren Werte entsprach.

Nun ist man ja sicherlich nicht ohne weiteres berechtigt, den Henleschen Schleifen jede sekretive Leistung abzusprechen, und Heidenhain hat denn auch den aufsteigenden Abschnitten der Henleschen Schlingen neben den gewundenen Kanälchen der Rinde eine sekretive Leistung wirklich zugeschrieben. Es sei aber hier darauf hingewiesen, daß gerade bei Heidenhains eigenen so bekannten Versuchen sich nach Injektion von indigschwefelsaurem Natron ins Blut nur der Rindenteil färbte, der Markteil aber vollkommen farblos blieb. Für die Annahme, daß die sekretive Hauptleistung nicht den Tubuli contorti, sondern den weiter abwärts gelegenen Röhren zufalle, liegt tatsächlich weder eine physiologische, noch eine anatomische Begründung vor.

Dagegen läßt sich eine ganze Reihe von Beobachtungen zugunsten der Annahme geltend machen, daß in den Markkanälchen eine Konzentration des Harnes durch Wasserresorption erfolgt.

Um Mißverständnissen vorzubeugen, möge hier ausdrücklich hervorgehoben werden, daß nicht etwa im Sinne der alten Ludwigschen Theorie die sekretive Funktion der Nierenepithelien geleugnet werden soll. Ebensowenig soll hier die Frage diskutiert werden, mit wieviel Recht die Annahme einer sekretiven Tätigkeit der Rindenepithelien im Sinne von Bowmann und Heidenhain durch die Vorstellung einer elektiven Resorption im Sinne Sobieranskis ersetzt werden könnte. Nur von der Annahme

einer Wasserresorption in den Markkanälchen, nicht aber von den Vorgängen in der Nierenrinde soll hier die Rede sein.

„Zieht man die eigentümliche, mehr einem Endothel gleichende Auskleidung der absteigenden Schleifenschenkel in Betracht“, sagt Metzner[1]), „desgleichen das Fehlen des Bürstensaumes im größten Teil der Schleifen, sowie in den Sammelröhren, ... so würde das Mark vornehmlich als Resorptionsstätte anzusehen sein.“

Zu den gleichen Schlußfolgerungen gelangte Hüfner[2]) auf Grund der vergleichend anatomischen Beobachtung, daß bei in Wasser lebenden Tieren, die also auf Wassersparung nicht angewiesen sind, das Kanalsystem des Nierenmarkes weit weniger ausgebildet ist als bei Landtieren.

Die Tatsache, daß von den Nieren ausgeschiedene Farbstoffe und Harnsäurekonkremente sich erst im Mark dichter ballen, daß bei Albuminurie sich das Eiweiß erst daselbst zu kompakten Zylindern verdichtet, ist im gleichen Sinne gedeutet worden; ebenso Ribberts[3]) histologische Beobachtungsreihe nach Injektion von Ferrocyankalium in das Nierenbecken, sowie von Karmin in das Markparenchym.

Ribbert suchte ferner die Annahme, daß der Harn in der Marksubstanz eingedickt werde, auf experimentellem Wege zu begründen, indem er die Markpyramide der Kaninchenniere mit dem Hohlmeißel entfernte. Die so operierten Tiere schieden zwei- bis dreimal soviel eines schwach gefärbten Harnes aus wie die Kontrolltiere.

Hans Meyer und Hausmann[4]) erzielten, nachdem sie eine Niere entfernt und das Mark der anderen exstirpiert hatten, eine Steigerung der Harnmenge auf das drei- bis vierfache. „Der vor der Operation dunkle, lehmige Harn (Haferkaninchen) von 1040 bis 1050 Dichte wurde alsbald hell, dünnflüssig und zeigte eine Dichte von 1009 bis 1011.“

Schließlich gehört ein von Bujniewicz[5]) beobachteter Fall aus der menschlichen Pathologie hierher, wo eine Nierenruptur mit konsekutiven krankhaften Veränderungen im Bereich der Marksubstanz und Bildung einer Harnleiterfistel die reichliche Ausscheidung eines verdünnteren Harnes aus der erkrankten Niere zur Folge hatte.

In den Rahmen dieser Erfahrungen fügen sich nun unsere Beobachtungen, welche uns die Möglichkeit geboten hatten, den osmotischen Druck des in den gewundenen Rindenkanälchen und in den Markkanälchen enthaltenen Harnes miteinander messend zu vergleichen, in ungezwungener Weise ein und wir glauben die-

---

[1]) R. Metzner, Die Absonderung und Herausbeförderung des Harnes. Nagels Handb. d. Physiol. 2, 262 (1907).

[2]) Hüfner, Zur vergleichenden Anatomie und Physiologie der Harnkanälchen. Leipzig 1866.

[3]) H. Ribbert, Über Resorption von Wasser in der Marksubstanz der Niere. Virch. Arch. 93, 169 (1883).

[4]) H. Meyer, Marb. Sitzungsber., Juli 1902, zit. Nagels Handb. 2, 264.

[5]) K. Bujniewicz, Zur Theorie der Harnbildung. Le Physiologiste russe 2, 196 (1904).

selben als eine kräftige Stütze für die Lehre von der resorptiven Funktion des Nierenmarkes auffassen zu dürfen.

Zusammenfassung.

1. Der osmotische Druck der Nierenrinde ist ein sehr konstanter und liegt bei allen untersuchten Tiergattungen (Schwein, Rind, Kaninchen, Katze) innerhalb der Grenzen des osmotischen Druckes einer 1 bis 2 proz. NaCl-Lösung. Er ist unabhängig von der Konzentration des ausgeschiedenen Harnes und erreicht selbst dann keinen höheren Wert, wenn der osmotische Druck des letzteren zu einem sehr hohen Niveau ansteigt.

2. Der osmotische Druck des Nierenmarkes ist dagegen außerordentlich variabel; er ist fast ausnahmslos wesentlich größer als derjenige der Nierenrinde, und zwar in um so höherem Maße, ein je konzentrierterer Harn ausgeschieden wird.

3. Wird durch Infusion von Wasser oder schwachen Salzlösungen die Ausscheidung eines sehr stark verdünnten Harnes erzielt, so kann der osmotische Druck des Nierenmarkes bis zu demjenigen der Nierenrinde heruntergedrückt werden.

4. Die Zellen des Nierenparenchyms nehmen hinsichtlich ihres osmotischen Verhaltens anderen Gewebszellen gegenüber keinerlei Ausnahmestellung ein und es kann ihre physiologische Leistung in bezug auf ihr Wasseranziehungsvermögen keineswegs auf einfachem, physikalisch-chemischem Wege erklärt werden.

5. Die molekulare Konzentration des Harnes erhebt sich, solange er innerhalb der gewundenen Nierenkanälchen verweilt, bei keiner der beobachteten Tierspezies über das $1^1/_2$ bis 2 fache der molekularen Konzentration des Blutes. Einen hohen osmotischen Druck, der bis zu einem Vielfachen des Blutwertes ansteigen kann, erlangt der Harn erst beim Passieren des Röhrensystems des Nierenmarkes.

6. Diese Erhöhung des osmotischen Druckes erklärt sich am ungezwungensten aus der Annahme einer im Nierenmark erfolgenden Rückresorption von Wasser.

XXXVI.

Einfluß der Temperatur auf die Ausflockung von Kolloiden.

Von **B. H. Buxton** und **Alfred H. Rahe.**

(Department of Experimental Pathology, Loomis Laboratory, Cornell Medical College, New York.)

Die Frage nach der Hydratation der Ionen in wässerigen Lösungen hat neuerdings viel Beachtung gefunden. Namentlich haben Biltz[1]) und Jones[2]) eine überaus große Zahl von Versuchen ausgeführt, um die Abhängigkeit des Hydratationsgrades von der Konzentration der Lösung zu zeigen.

Bousfield[3]) ermittelte durch Messungen, daß sowohl Temperatur als Konzentration einen erheblichen Einfluß darauf ausüben. Setzt man z. B. das Volumen des Wasserstoffions bei 20° gleich 1, so ist es bei 0° annähernd 0,8, bei 40° annähernd 1,2 und nimmt über 40° wieder ab.

Es kam uns der Gedanke, daß die wechselnde Hydratation des H-Ions vielleicht mit dem Phänomen der Vorzone zusammenhängt, das so oft bei der Ausflockung von Kolloiden durch Säuren beobachtet wird, und wir stellten darum eine Anzahl von Ausflockungsversuchen mit Säuren und Salzen bei wechselnder Temperatur an. Im ganzen fanden wir, daß mit Steigerung der Temperatur die Breite der Ausflockungszone zunahm, und Bakterien zeigten auf Säurezusatz bei 40° gelegentlich eine Neigung zum Auftreten von unregelmäßigen Reihen, die bei 0 und 20° nicht vorhanden war. Immerhin haben unsere Versuche keinen Zusammenhang zwischen dem angenommenen Hydratationsgrad des H-Ions und der Breite der Vorzonen bei verschiedenen durch

---

[1]) Zeitschr. f. physik. Chem. 40, 185 (1902).
[2]) Amer. Chem. Journ. 33, 34 (1905) und andere Journale.
[3]) Zeitschr. f. physik. Chem. 53, 257 (1905).

Säuren ausflockbaren Kolloiden ergeben; sie sollen daher hier nicht näher mitgeteilt werden.

Wenn wir nun zu Versuchen über die Ausflockung von Kolloiden durch Kolloide übergehen, haben wir über bemerkenswerte Ergebnisse zu berichten, die wir bei weitem nicht für aufgeklärt ansehen, wenngleich wir auf Grund von vorläufigen Arbeitshypothesen im nachstehenden einige Deutungsversuche machen.

Wir benutzten in diesen Versuchen Probierröhrchen von 9 cm Länge, die zu etwa 20 Stück in mit Gewichten beschwerten Eprouvettengestellen untergebracht waren. In die Röhrchen wurde 1 ccm der einen kolloidalen Lösung von wechselnder Konzentration eingefüllt und das Gestell in ein Wasserbad von der gewünschten Temperatur versenkt. Die andere Kolloidlösung wurde im ganzen durch Erwärmen oder Abkühlen auf die gleiche Temperatur gebracht und je 1 ccm davon mittels einer Maßpipette in die Röhrchen zu der ersten Kolloidlösung zugesetzt. Durch etwas heftiges Ausblasen der Pipette wurde eine genügende Mischung der beiden Flüssigkeiten erzielt, so daß kein Schütteln nötig war. Für die Temperaturen 0, 20 und 40° wurden systematische Versuchsreihen mit 1-, 3-, 5- und 24stündiger Dauer ausgeführt, Versuche bei 60 und 80° wurden nicht über 2 bis 3 Stunden ausgedehnt. Bei höherer Temperatur erfolgt die Flockenbildung so rasch, daß die Reaktion nach 2 Stunden praktisch zu Ende ist. Auch zeigte von den Versuchsreihen bei niederer Temperatur nur jene bei 0° nach 4 Stunden noch eine merkliche Änderung. Bei den Reihen mit 0° und 40° wurden die Gestelle nach 5 Stunden aus dem Wasserbade genommen und in den Eiskasten oder den auf 38° erwärmten Brutraum gebracht. Bei 20° wurde vom Wasserbade abgesehen, doch war die Temperatur des mit Dampf geheizten Arbeitsraumes stets nahe 20°.

Ausflockung von Kolloiden durch Kolloide.

Zwischen 0 und 100° weisen viele Kolloidlösungen erhebliche Veränderungen auf. Einzelne erstarren bei niederer Temperatur, z. B. Gelatine und Agar, andere bei höherer, z. B. Albumine. Die erstgenannte Veränderung ist reversibel, die letztere nicht. Das einmal durch Hitze koagulierte Eiweiß kann nicht mehr in kolloidale Lösung überführt werden, während Gelatine und Agar beliebig oft zum Erstarren und Schmelzen gebracht werden können[1]).

---

[1]) Lewites, Zeitschr. f. Chemie d. Kolloide 2, 16 (1908).

Wieder andere Kolloide werden innerhalb dieser Grenzen durch die Temperatur nicht beeinflußt. Eisenhydroxyd und kolloidales Platin können bis 0° abgekühlt und können gekocht werden, ohne daß Koagulation oder sichtbare Veränderung eintritt. Wenn sie aber — und ebenso manche andere künstlich erhältliche Kolloidlösungen — einmal durch andere Einwirkungen (Elektrolyte) zum Ausfällen gebracht worden sind, können sie nicht wieder durch Wasser allein in Lösung gebracht werden; dazu bedarf es dann eigener Methoden. Diese Kolloidlösungen sind somit irreversibel, obgleich ihre Haltbarkeit durch Temperaturen zwischen 0 und 100° nicht beeinflußt wird. Die Farbstoffe müssen danach, da sie getrocknet und dann jederzeit durch einfache Wasserzugabe wieder in kolloidale Lösung gebracht werden können, als reversible Kolloide angesehen werden[1]).

Wir können darnach die Kolloide in folgender Weise klassifizieren:

A. Zwischen 0 und 100° nicht koagulable Kolloide.

1. Reversibel: z. B. Farbstoffe.
2. Irreversibel: z. B. Eisenhydroxyd; kolloidales Platin.

B. Zwischen 0 und 100° koagulable Kolloide.

1. Reversibel: z. B. Gelatine, Agar, Stärke.
2. Irreversibel: z. B. Albumine.

Die von uns verwendeten Lösungen koagulabler Kolloide waren ausreichend verdünnt, um eine Ausfällung zwischen 0 und 100° zu vermeiden. Wir machten ferner auch von Bakterien- und Mastixsuspensionen Gebrauch.

Wir verzichten darauf, die Methoden, nach denen die verschiedenen von uns verwendeten Suspensionen und Lösungen dargestellt waren, näher zu beschreiben, nur sei bemerkt, daß zur Verdünnung durchweg gewöhnliches destilliertes Wasser verwendet wurde, und daß die Ausgangslösungen in jenen Fällen, wo sie notwendig Elektrolyten enthielten, z. B. bei einigen anorganischen Kolloiden und bei Bakteriensuspensionen, eine Woche lang der Dialyse gegen destilliertes Wasser unterworfen wurden.

Unser Hauptziel war stets die Bestimmung des Ausflockungspunktes, und dieser ist, wie uns die Erfahrung gelehrt hat, von der Gegenwart von Elektrolytspuren unabhängig. Die Ausflockungszone wird durch Anwesenheit merklicher Mengen von Elektrolyten verbreitert, das Optimum bleibt unverändert.

---

[1]) Biltz, Med.-naturwiss. Archiv 1, 267 (1908).

Farbstoffe.

Bei gegenseitiger Ausflockung zweier Farbsalze findet eine chemische Reaktion zwischen dem Kation des sauren und dem Anion des basischen Farbstoffs statt, so daß sich beim Optimum der Flockenbildung Säure und Base in äquimolekularem Verhältnis ausfällen. Es ist daher nicht zu erwarten, daß die Temperatur das Optimum beeinflußt. Das ergab auch der Versuch.

Tabelle I. Nachtblau und Biebricher Scharlach.
Endgültige Verdünnung des Nachtblau $^1/_{200}$ Proz.

Biebricher Scharlach Endverdünnung Proz.	0° 24 Stdn.	20° 24 Stdn.	40° 24 Stdn.	60° 3 Stdn.	80° 1 Stde.
$^1/_{20}$ bis $^1/_{100}$	—	—	—	—	—
$^1/_{150}$	—	—	—	+	+
$^1/_{200}$	—	—	+++	+++	+++
$^1/_{250}$	+++	+++	+++	+++	+++
$^1/_{300}$	+	++	+	+++	+++
$^1/_{400}$ bis $^1/_{\infty}$	—	—	—	—	—

Der äquimolekulare Punkt zwischen den zwei Farbsalzen ist annähernd $^1/_{250}$ Proz. Biebricher Scharlach zu $^1/_{200}$ Proz. Nachtblau. Wie aus Tabelle I ersichtlich, liegt das Optimum in der Nachbarschaft dieses Punktes unabhängig von der Temperatur. Dieselbe Regelmäßigkeit ergab sich bei Versuchen mit Kongorot-Nachtblau, Kongorot-Nilblau und in einigen anderen Beispielen.

Nimmt man hingegen ein nicht salzartig verbundenes negatives Kolloid, das dem basischen Farbsalz gegenüber keinen scharfen Neutralisationspunkt besitzt, so erhält man ganz abweichende Resultate.

Tabelle II ist typisch für die Reaktion zwischen basischen Farbstoffen und dialysierten Bakterienaufschwemmungen: Als Ausflockungsoptimum, das durch Fettdruck ausgezeichnet ist, ist der Punkt bezeichnet, wo die Flockenbildung am frühesten beginnt und in der Beobachtungsreihe am meisten hervortritt. Es entspricht nicht notwendig der Mitte der Ausflockungszone.

Nachtblau und Janusgrün wurden für die Proben gewählt, weil beide mit den verschiedenen Kolloiden enge Ausflockungszonen darbieten und das Optimum der Flockenbildung leichter zu erkennen gestatten, als weniger kolloidale Farbstoffe, z. B. Neutralrot und Methylenblau, deren Ausflockungszonen gewöhnlich sehr breit sind.

Tabelle II. Einfluß der Temperatur auf die Ausflockung von Bakteriensuspensionen durch basische Farbstoffe.

Nachtblau Endverdünnung Proz.	Bac. pyocyaneus			
	0°	20°	40°	60° 2 Stdn.
1/20 bis 1/50	—	—	—	—
1/100	—	—	++	+++
1/120	—	+	++	**+++**
1/140	—	+++	**+++**	+++
1/160	+	**+++**	—	—
1/200	**+++**	+	—	—
1/250	+++	—	—	—
1/300 bis 1/∞	—	—	—	—

Janusgrün Endverdünnung Proz.	Bac. coli comm.				
	0°	20°	40°	60° 2 Stdn.	80° 2 Stdn.
1/20 bis 1/100	—	—	—	—	—
1/150	—	—	—	—	++
1/200	—	—	—	+	—
1/250	—	—	+++	—	—
1/300	—	—	+	—	—
1/400	—	+++	—	—	—
1/600	++	—	—	—	—
1/800 bis 1/∞	—	—	—	—	—

Man sieht, daß mit Steigerung der Temperatur mehr Farbstoff erforderlich ist, um eine bestimmte Menge von Bakterien auszuflocken. Es liegt nahe, zu vermuten, daß bei erhöhter Temperatur umgekehrt weniger Bakterien zur Ausfällung einer gegebenen Farbstoffmenge ausreichen werden. Tabelle III A gibt ein Bild von diesem umgekehrten Verhalten.

Die in Tab. III A verwendete Suspension von Cholerabazillen war sehr konzentriert. Von dieser Ausgangssuspension waren die in der Tabelle angegebenen Verdünnungen hergestellt. Bei 0° wird die $^1/_{300}$ proz. Janusgrünlösung von einer $^1/_{100}$ Suspension ausgeflockt, während dazu bei 80° schon eine drei- oder viermal verdünntere genügt.

Agglutininbakterien[1]) verhalten sich, wie aus Tab. III B hervorgeht, genau wie normale; das Ausflockungsoptimum liegt für 0° annähernd bei $^1/_{500}$, für 20° bei $^1/_{300}$, für 40° bei $^1/_{150}$ Proz. Nachtblau.

[1]) Bechhold, Zeitschr. f. physik. Chemie 48, 385.

Tabelle III.

A. Gleicher Farbstoffgehalt bei wechselnder Bakterienmenge.

Cholera-suspension Verdünnungen Proz.	Janusgrün $^1/_{300}$ Proz.		
	0°	40°	80°
$^1/_{10}$ bis $^1/_{50}$.	—	—	—
$^1/_{100}$	+++	—	—
$^1/_{250}$	—	+++	—
$^1/_{300}$	—	—	+++
$^1/_{400}$	—	—	+++

B. Farbstoff und Agglutininbakterien.

Nachtblau End-verdünnung Proz.	Agglutinierte Colibakterien		
	0°	20°	40°
$^1/_{20}$ bis $^1/_{100}$.	—	—	—
$^1/_{150}$	—	—	+++
$^1/_{300}$	—	+++	—
$^1/_{500}$	+++	—	—
$^1/_{600}$ bis $^1/_{\infty}$.	—	—	—

Ferner macht es keinen Unterschied, wenn die Bakterien vorher auf 75° erhitzt oder selbst eine Stunde gekocht worden sind. Diese Behandlung pflegt das Optimum ein wenig zu verschieben, ändert aber nichts an der beobachteten Regel.

Tabelle IV. Nachtblaukonzentrationen, die zur optimalen Ausflockung von Bakterien bei verschiedenen Temperaturen erforderlich sind.

	Nachtblaukonzentrationen in Prozenten				
	Temperatur	Bazillen			
		nicht erhitzt	1 Stde. bei 75°	1 Stde. bei 100°	
Cholerabazillen	0°	$^1/_{180}$	$^1/_{160}$	$^1/_{180}$	Überall dieselbe Suspension
	20	$^1/_{160}$	$^1/_{140}$	$^1/_{180}$	
	40	$^1/_{160}$	$^1/_{120}$	$^1/_{160}$	
Coli comm. . .	0	$^1/_{320}$	$^1/_{200}$	$^1/_{200}$	Überall dieselbe Suspension
	20	$^1/_{180}$	$^1/_{180}$	$^1/_{180}$	
	40	$^1/_{140}$	$^1/_{140}$	$^1/_{140}$	
Pyocyaneus . .	0	$^1/_{240}$	$^1/_{280}$	$^1/_{240}$	Überall dieselbe Suspension
	20	$^1/_{160}$	$^1/_{240}$	$^1/_{180}$	
	40	$^1/_{140}$	$^1/_{160}$	$^1/_{140}$	
	60	$^1/_{120}$	$^1/_{140}$	$^1/_{140}$	

Es sei hier bemerkt, daß das Optimum nicht in jedem Experiment dasselbe ist. Es ändert sich vielmehr mit der Kon-

zentration der Bakteriensuspension, da es einerseits weniger Farbstoff bedarf, die Suspension auszuflocken, wenn sie verdünnter ist, da es andererseits unmöglich ist, Bakterienaufschwemmungen von genau gleichem Gehalt herzustellen. Allein die Proben der Tabelle IV sind vergleichbar, da für jede Bazillenart die gleiche Ausgangssuspension erhitzt, bzw. nicht erhitzt, zur Verwendung kam. Man bemerkt, daß das Optimum mit der Temperatursteigerung etwas ansteigt. Ähnliches wurde bei anderen Suspensionen und kolloidalen Lösungen beobachtet, wenn sie durch basische Farbstoffe ausgeflockt wurden.

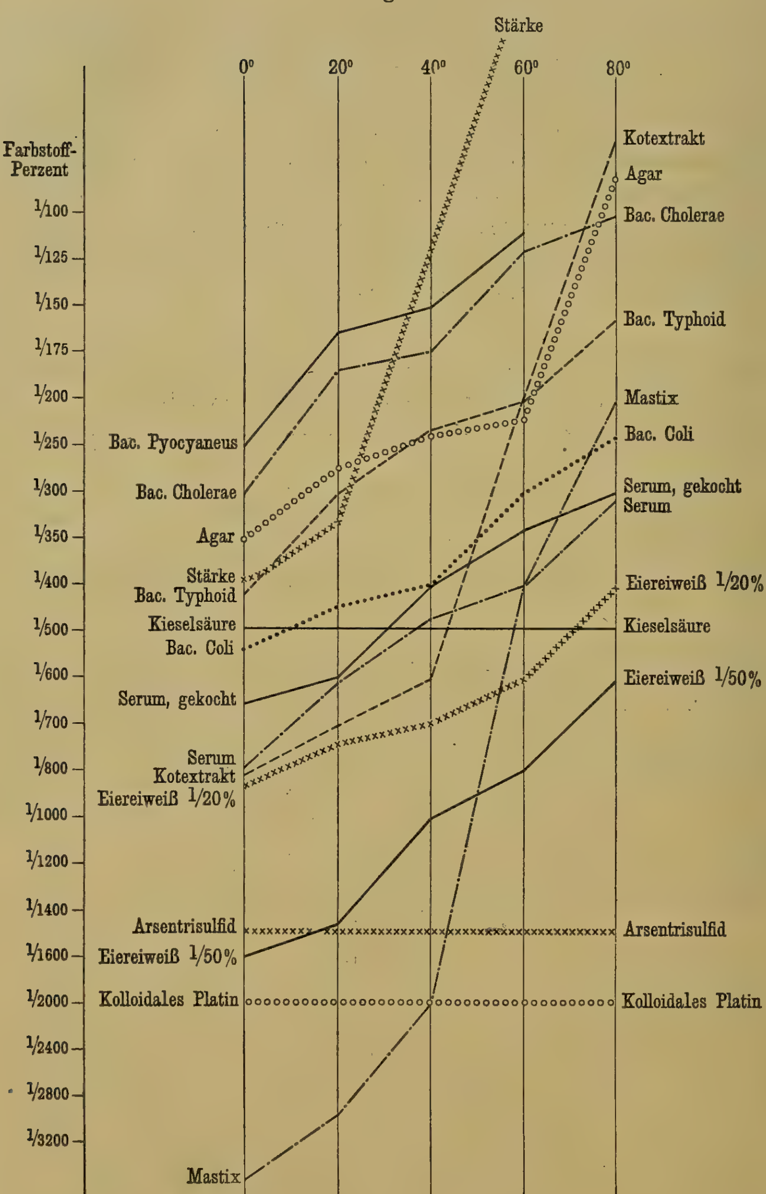
Tabelle V. Annähernde Ausflockungsoptima für Nachtblau und verschiedene negative Kolloide.

Kolloid	Verdünnung	Nachtblau, Prozente bei				
		0°	20°	40°	60°	80°
Stärke	dünne Lösung	1/400	1/350	1/150	keine Ausflockung	keine Ausflockung
Agar	1/80 Proz.	1/350	1/300	1/250	1/250	1/80 [1])
Kotextrakt	1/400 der Ausgangslösung	1/800	1/700	1/600	1/200	1/50 [1])
Mastix	1/60 der Ausgangslösung	1/4000	1/3000	1/2000	1/400 [1])	1/200 [1])
Kaninchenserum .	1/400	1/800	1/600	1/500	1/400	1/300
Kaninchenserum, gekocht	1/400	1/700	1/600	1/400	1/350	1/300
Eiweiß	1/50 Proz.	1/1800	1/1500	1/1000	1/800	1/600
Eiweiß, gekocht .	1/50 „	1/2000	1/1500	1/1500	1/1000	1/600
Gelatine	1/8 „	keine Flocken, partiell erstarrt	1/350	keine Flocken	keine Flocken	—

In Tabelle VI sei eine Versuchsreihe mit Mastix und Nachtblau ausführlich mitgeteilt. Obgleich sie ganz unabhängig von dem entsprechenden in Tabelle V angeführten Versuche ausgeführt war, stimmen die Ergebnisse innerhalb der Fehlergrenzen genau überein. Der umgekehrte Versuch, wo die Farbstoffkonzentration konstant bleibt und der Gehalt der Mastixemulsion wechselt, steht in Analogie mit dem Versuch in Tabelle III A, betreffend Cholerabazillen und Janusgrün.

[1]) Unvollständige Flockenbildung.

Fig. 1.



Die vorstehende Kurventafel zeigt deutlicher als die Tabellen das regelmäßige Ansteigen der Mengen an Farbstoff, Nachtblau oder Janusgrün, die bei steigender Temperatur zur Aus-

Tabelle VI.

Nachtblau Proz.	Mastix, $^1/_{60}$ der Ausgangslösung 0°	20°	40°	60°	80°
$^1/_{20}$ bis $^1/_{100}$.	—	—	—	—	—
$^1/_{200}$	—	—	—	—	+
$^1/_{250}$ bis $^1/_{400}$.	—	—	—	—	—
$^1/_{500}$	—	—	—	+	—
$^1/_{600}$ bis $^1/_{1000}$	—	—	—	—	—
$^1/_{1500}$	—	—	+++	—	—
$^1/_{2000}$	—	+	**+++**	—	—
$^1/_{3000}$	++	**+++**	—	—	—
$^1/_{4000}$	++	+	—	—	—
$^1/_{6000}$ bis $^1/_{\infty}$	—	—	—	—	—

Mastix Verdünnung der Ausgangslösung Proz.	Nachtblau $^1/_{400}$ Proz. 0°	20°	40°	60°	80°
$^1/_4$	—	—	—	—	—
$^1/_6$	+++	+++	++	—	—
$^1/_{10}$	—	—	+++	—	—
$^1/_{20}$	—	—	++	—	—
$^1/_{30}$	—	—	—	—	—
$^1/_{60}$	—	—	—	+	—
$^1/_{80}$ bis $^1/_{450}$.	—	—	—	—	—
$^1/_{500}$	—	—	—	—	Sp.
$^1/_{600}$ bis $^1/_{\infty}$.	—	—	—	—	—

flockung einiger Kolloide erforderlich sind. Dabei fällt sofort auf, daß die aufsteigenden Linien — die der Bequemlichkeit wegen als Kurven bezeichnet sein mögen — einen doppelten Typus (I und II) aufweisen. Ein dritter Typus ist durch die Gerade vertreten. Die Lage der Kolloide in dem Kurvenbild ist ausschließlich durch die Konzentration bedingt. Die Resultate zweier Versuchsreihen mit Eiweiß sind nur mitgeteilt, um zu zeigen, daß gesteigerte Verdünnung bloß die Lage der Kurve, nicht aber ihren Typus ändert. Um ideale Kurven zu erhalten, müßte man die Konzentration der Kolloide so wählen, daß sie bei einem gegebenen Gehalt, z. B. $^1/_{1000}$ Proz. der Farbstofflösung, ihren Nullpunkt hätten. Das würde jedoch monatelange Arbeit erfordert haben, ohne den wirklichen Wert der bildlichen Darstellung zu erhöhen.

Von den Kurven zeigen einzelne zuerst ein allmähliches, dann bei höherer Temperatur ein sehr rasches; andere dagegen ein mehr gleichmäßiges Ansteigen. Der erstere Typus ist am deutlichsten bei Stärke, Kotextrakt und Mastix ausgesprochen. Nur bei Mastix findet sich am Schluß, bei 60 bis 80°, ein rapides Ansteigen. Der zweite Typus ist durch Serum, Eiweiß und Bakterien vertreten.

Wir finden, daß die Ausflockung der Kolloide des ersten Typus an Farbstoff bei 80° erfordert:

von Stärke . . . . . etwa ∞ mehr als bei 0°
" Mastix . . . . . " 20 mal mehr " " "
" Kotextrakt . . . " 16 " " " " "
" Agar . . . . . . " $4^1/_2$ " " " " "

Ebenso bei den Kolloiden des zweiten Typus bei 80°

von Serum	etwa	$2^2/_3$	mal	mehr	als	bei	0°
„ gekochtem Serum . . .	„	$2^1/_3$	„	„	„	„	„
„ Eiweiß $^1/_{50}$	„	3	„	„	„	„	„
„ Eiweiß $^1/_{20}$	„	2	„	„	„	„	„
„ Bac. coli comm.	„	$2^1/_3$	„	„	„	„	„
„ Bac. typhi abd.	„	$2^1/_2$	„	„	„	„	„
„ Bac. cholerae	„	3	„	„	„	„	„

Agar scheint zunächst dem zweiten Typus anzugehören, doch entspricht seine Kurve zwischen 60 und 80° vielmehr dem Typus I.

Von den dem ersten Typus angehörenden Kolloiden sind Stärke und Agar reversibel und neigen daher bei Temperaturerhöhung zu einer Abnahme ihrer kolloidalen Beschaffenheit. Eine Mastixsuspension verliert beim Erhitzen viel von ihrer Undurchsichtigkeit, wird somit anscheinend weniger kolloidal. Vom Kotextrakt (klar filtrierter macerierter Darminhalt vom Kaninchen) ist nichts näheres bekannt; doch konnte die dunkelbraune Ausgangslösung, die keine Eiweißreaktion darbot, beliebig lange gekocht werden, ohne zu koagulieren, oder sonst eine merkliche Veränderung zu erfahren. Es scheint danach, daß sie ihre kolloidalen Eigenschaften einem reversiblen Kolloid verdankt, das beim Erhitzen minder kolloidal wird, vielleicht dem sogenannten Stercobilin, einem Umwandlungsprodukt der Gallenfarbstoffe.

Eine weitere Erscheinung, die dem Typus I anzugehören scheint, ist die unvollständige Ausflockung mit Agar, Kotextrakt und Mastix bis 80°, die das Bild der gegenseitigen Ausflockung von Kolloiden niederen Grades darbietet. Auch in diesem Punkte entspricht Agar mehr dem Typus I. Da Agar in einer Konzentration, die es zum Erstarren befähigt, nicht unter 100° schmilzt, so kann man nicht erwarten, daß seine kolloidale Beschaffenheit beim Erhitzen eher abnimmt als in der Nähe des Siedepunktes.

Dem Typus II gehören das Serum und Eiweiß an, die in verdünnter Lösung wahrscheinlich wenig durch eine Temperaturerhöhung bis 80° beeinflußt werden, oder, falls dies geschieht, eher zu einer Vergrößerung der Aggregate neigen dürften. Ihnen schließen sich die Bakterien an, die ja aller Wahrscheinlichkeit nach durch die Eiweißkörper ihrer Oberfläche, die als Schutzkolloid wirken, in Suspension erhalten werden.

Der dritte Typus, eine horizontale Gerade, findet sich bei den anorganischen Kolloiden: Arsentrisulfid, kolloidalem Platin und Kieselsäure. Sie bilden eine Gruppe für sich, die sich von den

organischen Kolloiden dadurch unterscheidet, daß zu ihrer Fällung bei erhöhter Temperatur nicht mehr Farbstoff erforderlich ist, als bei niederer.

In Tabelle VII sind zwei Versuche mit anorganischen Kolloiden näher ausgeführt.

Tabelle VII. Farbstoffe und anorganische Kolloide.

Janusgrün Proz.	Kolloidales Platin				
	0°	20°	40°	60°	80°
1/20 bis 1/800	—	—	—	—	—
1/1000	+	+	+++	—	+++
1/1500	+++	+++	**+++**	+++	+++
1/2000	**+++**	**+++**	+++	**+++**	**+++**
1/3000	+	—	—	+++	+++
1/4000 bis 1/∞	—	—	—	—	—

Nachtblau Proz.	Arsentrisulfid				
	0°	20°	40°	60°	80°
1/20 bis 1/1000	+	—	—	—	—
1/1500	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**
1/2000	+	+++	+++	+++	+++
1/3000	—	++	—	—	+++
1/4000	—	—	—	—	+++
1/5000 bis 1/∞	—	—	—	—	—

Tabelle VII zeigt, daß das Optimum der Ausflockung von kolloidalem Platin durch Janusgrün für alle Temperaturen, abgesehen von einer innerhalb der Fehlergrenzen liegenden Abweichung bei 40°, bei 1/2000 Proz. liegt. Die Konzentration von 1/1500 Proz. Nachtblau ist das Optimum der Ausflockung von Arsentrisulfid, wenngleich die Fällungszone bei 80° eine Verbreiterung zeigt. Es sei daran erinnert, daß der optimale Punkt nicht notwendig in der Mitte der Ausflockungszone liegt, sondern jener Konzentration entspricht, bei der die Flockenbildung am raschesten auftritt und in der ersten Zeit am meisten ausgesprochen ist. Ohne sorgfältige Beobachtung von Anfang an kann man ihn leicht übersehen.

Wird das Arsentrisulfid oder das kolloidale Platin vorher eine Stunde lang gekocht, so ändert das weder die Ausflockungszone, noch den optimalen Punkt. Das Kochen scheint auf diese zwei anorganischen Kolloide ganz ohne Einfluß zu sein.

Theoretische Betrachtungen.

Wir haben aus Tabelle III bereits entnommen, daß sich bei Variation des Bakteriengehalts und konstanter Farbstoffkonzentration eine absteigende Kurve ergibt. Ein ähnliches Experiment mit Mastix in Tabelle VI liefert eine umgekehrte Kurve. Die absteigende Kurve zeigt den gleichen Typus wie die aufsteigende Kurve, die durch Variation der Farbstoffkonzentration erhalten wird, so daß beide Kurven sich wie Spiegelbilder verhalten. Es ist daher einleuchtend, daß in jedem Fall mit dem Ansteigen der Temperatur mehr Farbstoff und weniger organisches Kolloid zur Auslösung der Flockenbildung benötigt werden. Bei den reversiblen Kolloiden sind die Unterschiede viel größer als bei irreversiblen.

Da Farbstoffe reversible Kolloide sind, so ist zu erwarten, daß sie in der Wärme weniger kolloidal werden, und Versuche mit Dialyse scheinen dies zu bestätigen. Hätten wir es sonach nur mit Typus II zu tun, wo der kolloidale Charakter der Bakterien sich anscheinend nicht ändert, während der des Farbstoffs mit Temperaturerhöhung abnimmt, so könnte die Erklärung der Erscheinung in der Annahme gefunden werden, daß der Farbstoff, indem er an kolloidaler Beschaffenheit verliert, auch an Fähigkeit einbüßt, die Bakterien auszuflocken, und umgekehrt die Bakterien in dem Maße fähiger werden, den Farbstoff auszuflocken, als dieser weniger kolloidal wird.

Eine solche Erklärung ist jedoch nicht stichhaltig, da Stärke, Agar und Mastix mit dem Ansteigen der Temperatur weniger kolloidal werden und daher auf die Kurven den umgekehrten Einfluß ausüben müßten. Aber im Gegenteil zeigen die Kurven mit diesen reversiblen Kolloiden bei höheren Temperaturen das steilste Ansteigen.

Wir können daher nur sagen, daß mit steigender Temperatur die Affinität der organischen Kolloide zu den Farbstoffen zunimmt, was durchaus mit den Erfahrungen der praktischen Färberei im Einklang steht, aber keine Erklärung der Erscheinung darstellt. Diese Regel trifft überdies für die anorganischen Kolloide nicht zu.

Es scheint schwierig, diese Temperaturkurven mit der geläufigen Theorie in Einklang zu bringen, wonach die Ausflockung durch die Neutralisation elektrischer Ladungen zustande kommt. Wenn die Annahme richtig ist, daß die Farbstofflösung durch Erwärmen weniger kolloidal wird, Serum und Bakteriensuspension aber nicht, dann wäre zu vermuten, daß in der Farbstofflösung die Zahl der elektrisch geladenen Aggregate zunimmt, und danach sollte weniger Farbstoff zur Ausflockung einer gegebenen Bakterienmenge erforderlich sein. Allein gerade das Gegenteil ist der Fall.

Es scheint kein genügender Grund für die Annahme gegeben, daß ein großes kolloidales Aggregat relativ oder absolut stärker geladen ist als ein kleineres. Wahrscheinlich besteht das Aggregat eines Farbsalzes aus einer Anzahl nicht dissoziierter Moleküle und einem dissoziierten, welchem es die elektrische Ladung verdankt. Bei Steigerung der Temperatur und entsprechend erhöhter Tendenz zur Ionisation dürften die Aggregate zerfallen und kleiner werden, aber jedes einzelne Aggregat dürfte noch ein dissoziiertes Molekül enthalten und die gleiche elektrische Ladung — die natürliche Einheit — tragen, wie das größere Aggregat, aus dem es hervorgegangen ist.

Basische Hydroxyde.

Nimmt man statt eines basischen Farbstoffs ein basisches Hydroxyd, z. B. Eisenhydroxyd, so ergibt sich beim Erwärmen keine merkliche Änderung des Optimums.

In Tabelle VIII sind die Resultate angeführt, die einerseits mit zwei irreversiblen und zwei reversiblen Kolloiden, andererseits mit zwei negativen Farbsalzen erhalten wurden. An einigen Stellen ist eine Tendenz zur Erhöhung des Ausflockungsoptimums bei 80° erkennbar, doch sind wir geneigt, dies der Unvollkommenheit der Methode zuzuschreiben. Wenn kolloidales Ferrihydroxyd in einem Probierglas gekocht wird, so fällt es schließlich aus, vermutlich infolge der Spuren Kieselsäure, die aus dem Glas aufgenommen werden. Es ist sehr wohl möglich, daß Spuren von Kieselsäure — vermutlich kolloidaler — schon bei 80° in Lösung gehen, sich mit einem Teil des Ferrihydroxyds verbinden und so seine Wirkung abschwächen.

Ferrihydroxyd verhält sich sonach anscheinend gegenüber negativen Kolloiden sehr ähnlich wie Arsentrisulfid und die

Tabelle VIII. Ferrihydroxyd mit verschiedenen Kolloiden.

$Fe(OH)_3$ Verdünnung	Serum $^1/_{200}$ Proz.				
	0°	20°	40°	60°	80°
$^1/_{10}$ bis $^1/_{20}$	—	—	—	—	. . .
$^1/_{40}$	+++	++	++	+	. . .
$^1/_{80}$	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	. . .
$^1/_{150}$	—	+	+++	+	. . .
$^1/_{200}$ bis $^1/_{\infty}$	—	—	—	—	. . .
$Fe(OH)_3$	Stärke $^1/_8$ Proz.				
$^1/_{10}$ bis $^1/_{20}$	—	—	—	—	—
$^1/_{40}$	+++	+	+	+	+++
$^1/_{80}$	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**
$^1/_{120}$	+++	+++	+++	+++	—
$^1/_{150}$ bis $^1/_{\infty}$	—	—	—	—	—
Kongorot	Ferrihydroxyd $^1/_{100}$ Proz.				
$^1/_{20}$ bis $^1/_{200}$	—	—	—	—	—
$^1/_{300}$	+++	+++	+++	+++	+++
$^1/_{400}$	+++	+++	—?	+++	+++
$^1/_{600}$	—	—	+++	—	+++
$^1/_{800}$ bis $^1/_{\infty}$	—	—	—	—	—

$Fe(OH)_3$ Verdünnung	Typhusbazillen				
	0°	20°	40°	60°	80°
$^1/_{50}$	—	—	—	—	—
$^1/_{100}$	—	—	—	—	+++
$^1/_{150}$	++	—	+++	+++	**+++**
$^1/_{200}$	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	—
$^1/_{250}$ bis $^1/_{\infty}$	—	—	—	—	—
	Kotextrakt				
$^1/_{20}$ bis $^1/_{60}$	—	—	—	—	—
$^1/_{80}$	+++	++	+++	+++	+++
$^1/_{100}$	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**
$^1/_{150}$	+++	+++	+++	+++	+++
$^1/_{200}$ bis $^1/_{\infty}$	—	—	—	—	—
$Fe(OH)_3$	Alizarinrot $^1/_{400}$ Proz.				
$^1/_{20}$	—	—	—	—	—
$^1/_{50}$	—	—	—	—	+++
$^1/_{100}$	+++	+++	+++	+++	—
$^1/_{150}$ bis $^1/_{\infty}$	—	—	—	—	—

übrigen untersuchten anorganischen Kolloide gegenüber basischen. Bei graphischer Darstellung würde es eine Gerade geben.

Mastix scheint dagegen eine Ausnahme von dieser Regel zu bilden. Es gibt in diesem Falle eine Kurve, die dem Typus I der Tafel entspricht.

Tabelle IX. Ferrihydroxyd und Mastix.

$Fe(OH)_3$ Verdünnung	Versuchsreihe I — Mastix $^1/_{60}$ Ausgangslösung				
	0°	20°	40°	60°	80°
$^1/_{20}$ bis $^1/_{200}$	—	—	—	—	—
$^1/_{400}$	—	—	—	—	**+++**
$^1/_{600}$	—	—	—	+	+
$^1/_{800}$	—	—	—	**++**	—
$^1/_{1000}$	—	—	+++	+	—
$^1/_{2000}$	—	—	**+++**	—	—
$^1/_{4000}$	**+++**	**+++**	**+++**	—	—
$^1/_{8000}$	+++	+	++	—	—

Mastix Verdünnung	Versuchsreihe II — $Fe(OH)_3$ $^1/_{1200}$ Ausgangslösung				
	0°	20°	40°	60°	80°
$^1/_2$	+++	+++	+++	—	—
$^1/_{10}$	+++	+++	+++	—	—
$^1/_{20}$	+++	+++	+++	—	—
$^1/_{50}$	—	—	+++	—	—
$^1/_{100}$	—	—	—	**+++**	—
$^1/_{150}$	—	—	—	+++	**+++**
$^1/_{200}$	—	—	—	+++	**+++**
$^1/_{300}$	—	—	—	—	—

Tabelle IX zeigt, daß bei Erhöhung der Temperatur zur Ausflockung mehr Ferrihydroxyd und weniger Mastix benötigt wird. In der Versuchsreihe I ist bei 80° zehnmal mehr Ferrihydroxyd erforderlich als bei 0°, und ähnliche Verhältnisse weisen die anderen Proben auf. Die beiden Versuchsreihen wurden ganz unabhängig voneinander angestellt, trotzdem fallen die Optima sehr nahe zusammen. Bei den niederen Temperaturen sind die Zonen etwas breit und das Optimum konnte nicht sehr scharf bestimmt werden, aber bei 60 und 80° tritt es beiderseits sehr gut hervor.

So ergibt sich aus Reihe I bei 60° $^1/_{800}:{}^1/_{60} = {}^1/_{1200}:{}^1/_{90}$, während in Reihe II $^1/_{100}$ gefunden wird.

Aus Reihe I bei 80° berechnet sich $^1/_{400}:{}^1/_{60} = {}^1/_{1200}:{}^1/_{180}$, während der Versuch in Reihe II einen Wert zwischen $^1/_{150} - {}^1/_{200}$, annähernd $^1/_{175}$ ergibt.

Einige wenige Versuche mit Aluminiumhydroxyd lieferten ganz analoge Resultate wie jene mit Ferrihydroxyd, einschließlich der Ausnahme bei Mastix. Dieses wird sonach von den basischen Hydroxyden in sehr ähnlicher Weise beeinflußt wie die Farbstoffe; die anderen untersuchten Kolloide scheinen dagegen, wenn sie mit Hydroxyd zusammengehalten werden, einer ganz anderen Regel zu folgen.

Es scheint nicht möglich, für diese verschiedenen Erscheinungen eine allgemein gültige Deutung zu finden, doch scheinen die Versuche darauf hinzuweisen, daß wir es mit vier Gruppen von Kolloiden zu tun haben, zwischen denen, soweit es nach ihrem Verhalten gegen Wärmeschwankungen erkennbar ist, irgend welche tiefgreifende Unterschiede bestehen.

Kolloide	Bei Erhöhung der Temperatur
1. Farbstoffe	Leichter von organischen, nicht von anorganischen Kolloiden aufgenommen.
2. Reversible organ. Kolloide	Sehr gesteigerte Farbstoffaffinität, keine Steigerung gegenüber anorganischen Kolloiden[1]).
3. Irreversible organ. Kolloide	Mäßig gesteigerte Farbstoffaffinität, keine Steigerung gegenüber anorganischen Kolloiden[1]).
4. Anorganische Kolloide	Keine Änderung der Affinität für Farbstoffe oder andere Kolloide[1]).

Einige wenige Versuche mit basischen Hydroxyden gegenüber negativen anorganischen Kolloiden führten zu keinem positiven Ergebnis. Die Ausflockungszonen waren breit und die Optima konnten nicht befriedigend bestimmt werden. Immerhin waren Anzeichen dafür vorhanden, daß die Temperaturerhöhung keinen Einfluß auf die Lage des Ausflockungsoptimums hat.

Reversion.

Wie oben gezeigt, variiert die Zone der Ausflockung von negativen Kolloiden durch basische Farbstoffe erheblich mit der

[1]) Mit Ausnahme von Mastix gegenüber $Fe(OH)_3$ und $Al(OH)_3$.

Versuchstemperatur. Es schien von Interesse, festzustellen, ob nach Ausflockung bei einer gegebenen Temperatur mit Änderung derselben eine Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes eintritt. Tabelle X, Nachtblau — Stärke, ist typisch für die dabei gewöhnlich gefundenen Resultate. Sie ist ausführlich mitgeteilt, damit die Umkehrung in einer ganzen Reihe von Proben ersichtlich wird, was einen zufälligen Befund ausschließt.

Tabelle X. Reversion. Nachtblau und Stärke.

Nachtblau	Stärke $^1/_8$ Proz.			
	Versuchsreihe I		Versuchsreihe II	
Proz.	0° 24 Stdn.	24 Stdn. bei 0°, dann 24 Stdn. bei 40°	40° 24 Stdn.	24 Stdn. bei 40°, dann 24 Stdn. bei 0°
$^1/_{20}$ bis $^1/_{100}$ . .	—	—	—	—
$^1/_{120}$	—	—	++	++ [1]
$^1/_{140}$	—	+++	+++	+++ [1]
$^1/_{160}$	—	+++	+++	+++ [1]
$^1/_{180}$	—	+++	+++	+++ [1]
$^1/_{200}$	—	+++	+++	+++ [1]
$^1/_{240}$	—	+++	—	—
$^1/_{280}$	++	+++	—	— [2]
$^1/_{320}$	++	— [3]	—	— [2]
$^1/_{360}$	+++	— [3]	—	— [2]
$^1/_{400}$	+++	— [3]	—	— [2]
$^1/_{480}$	+++	— [3]	—	— [2]
$^1/_{560}$	++	— [3]	—	— [2]
$^1/_{640}$ bis $^1/_{\infty}$ . .	—	—	—	—

Wie aus Tabelle X hervorgeht, ließen wir in Versuchsreihe I Nachtblau 24 Stunden bei 0° auf Stärke einwirken, die Ausflockungszone reicht von $^1/_{260}$ bis $^1/_{560}$ Proz. Nachtblau. Nachdem die Proben dann 24 Stunden bei 38 bis 40° gehalten worden waren, ergibt sich die Ausflockungszone von $^1/_{140}$ bis $^1/_{180}$ Proz. und die Proben $^1/_{320}$ bis $^1/_{660}$ Proz. zeigen völlige Umkehrung. Der Typus der Ausflockung entspricht praktisch genau jenen der ersten Spalten von Reihe II, wo vorher nicht mit einer Temperatur von 0° behandelt worden war.

---

[1]) Keine Umkehrung.

[2]) Keine Flockenbildung bei 0°, wie sie ohne vorheriges Erhitzen auf 40° eingetreten wäre.

[3]) Umkehrung.

In Reihe II, wo die Proben erst 24 Stunden bei 40°, dann die gleiche Zeit oder gar 48 Stunden bei 0° gehalten wurden, ist nicht bloß keine Umkehrung in den Proben mit $^1/_{120}$ bis $^1/_{280}$ Proz. nachweisbar, sondern es fehlt auch die Ausflockung von $^1/_{280}$ bis $^1/_{560}$, die ohne vorgängige Behandlung bei 40° hätte eintreten sollen.

Bakterien zeigen dasselbe Verhalten.

Tabelle XI. Reversion. Janusgrün und Cholerabazillen.

Cholera-ausgangssuspension Verdünnung	Janusgrün $^1/_{300}$ Proz.				
	Normale Ausflockungszone			Änderung mit Temperaturerhöhung	
	0° 24 Stdn.	40° 24 Stdn.	80° 3 Stdn.	zuerst 0°, dann bei 40° 24 Stdn.	zuerst 0°, dann bei 80° 3 Stdn.
$^1/_{10}$ bis $^1/_{40}$	—	—	—	—	—
$^1/_{50}$	++	—	—	—[1]	—
$^1/_{100}$	+++	—	—	—[1]	—
$^1/_{150}$	+++	+++	—	+++	—[1]
$^1/_{200}$	+++	—	—	+	—[1]
$^1/_{250}$	—	+++	—	+++	+[2]
$^1/_{300}$	—	+++	—	+++	+[2]
$^1/_{350}$	—	—	+++	—	+++
$^1/_{400}$	—	—	+++	—	+++

Janusgrün Proz.	Cholerabazillen			
	20° 24 Stdn.	80° 1 Stde.	1 Stde. bei 80°, dann bei 20° 24 Stdn.	
$^1/_{20}$ bis $^1/_{60}$	—	—	—	
$^1/_{80}$	—	+++	+++	Keine Umkehrung
$^1/_{100}$	—	+++	+++	
$^1/_{120}$	—	+++	+++	
$^1/_{140}$	+	++	++	
$^1/_{160}$	+++	—	—	Keine Flockenbildung
$^1/_{180}$	+++	—	—	
$^1/_{200}$	+++	—	—	
$^1/_{240}$	+	—	—	

[1]) Völlige Umkehrung.
[2]) Teilweise Umkehrung.

Die ersten drei Spalten der Tabelle XI geben die Ausflockungszonen der Cholerabazillen durch Janusgrün bei 0, 40 und 80°; Spalte 4 lehrt, daß eine vollständige Änderung im Ausflockungstypus eintritt, wenn die 0°-Reihe 24 Stunden bei 40° gehalten wird. Ebenso erfolgt die Ausflockung nahezu ganz nach dem Typus der 80°-Reihe, sobald die 0°-Reihe 3 Stunden auf 80° erwärmt worden ist. Wahrscheinlich wäre bei längerer Dauer des Erhitzens die Umkehrung auch bei $^1/_{250}$ und $^1/_{300}$ Proz. vollständig geworden. Nach Einwirkung von 80° wurden die Proben 24 Stunden bei 20° gehalten, ohne daß Änderung eintrat. Dieses Endstadium ist in der Tabelle nicht verzeichnet, wohl aber finden wir in Reihe 2, daß beim Heruntergehen von 80 auf 20° in den Proben mit $^1/_{80}$ bis $^1/_{140}$ Proz. Janusgrün keine Umkehrung eintritt, ebenso daß die Ausflockung bei $^1/_{160}$ bis $^1/_{240}$ Proz. ausbleibt, wo sie normalerweise bei 20° hätte erfolgen müssen.

Andere untersuchte Bakterien, so Typhus-, Coli- und Pyocyaneusbazillen, zeigen die gleiche Reversion sowohl mit Janusgrün als auch mit Nachtblau.

Eine Umkehrung vom Typus der höheren zu jenem niederer Temperatur wurde niemals beobachtet, aber auch die Reversion von niedrigen zu hohen Temperaturen gibt nicht bei allen Kolloiden befriedigende Resultate. Die Ausflockungszonen von Serum- und Eiereiweiß sind breit und decken sich bei verschiedenen Temperaturen zum Teil, so daß die Randzonen, in denen sich die Umkehrung zeigen kann, verhältnismäßig schmal sind, so daß ihr Auftreten einigermaßen zweifelhaft bleibt. Doch sind Anzeichen dafür vorhanden, daß Serumalbumin eine unvollkommene Umkehrung zeigt, Eieralbumin aber nicht.

Es ist von Interesse, daß Bakterien, die an sich leicht die Reversion der Ausflockung zeigen, sich nach einstündigem Kochen insofern abweichend verhalten, als sie keine Umkehrung der durch Erwärmen erreichten Ausflockung, aber auch keine Behinderung derselben bei niederer Temperatur zeigen, wie sie sonst nach Erwärmen eintritt.

Nach dem Erhitzen der Bakterien auf 75° ist die Reversion vielleicht etwas weniger deutlich als vorher ohne vorgängiges Erhitzen. Bei der großen Zahl der sowohl mit unerhitzten als mit gekochten Bakterien ausgeführten Versuche kann an der Richtigkeit der Beobachtung kein Zweifel sein.

Aus Tabelle XII entnimmt man, daß die Ausflockung von gekochten Bakterien durch Janusgrün bei 0° von $^1/_{300}$ bis $^1/_{400}$ Proz.

Tabelle XII. Reversionsversuch. Gekochte Typhusbazillen und Janusgrün.

Die Typhusbazillen in dünner Suspension.

Janusgrün Proz.	Erst niedrige, dann höhere Temperatur					
	0°	erst 0°, dann 40°	40°	20°	erst 20°, dann 5 Stdn. bei 60°	3 Stdn. bei 60°
$^1/_{20}$ bis $^1/_{60}$ . .	—	—	—	—	—	—
$^1/_{100}$	—	—	—	—	—	—
$^1/_{150}$	—	—	—	—	++	+
$^1/_{200}$	—	—	—	—	+++	++
$^1/_{250}$	—	+++	+++	—	+++	+++
$^1/_{300}$	+	+++[1]	—	+++	+++[1]	—
$^1/_{350}$	++	+++[1]	—	++	++[1]	—
$^1/_{400}$	++	++[1]	—	++	++[1]	—
$^1/_{500}$ bis $^1/_{\infty}$.	—	—	—	—	—	—

Janusgrün Proz.	Erst höhere, dann niedrige Temperatur					
	2 Stdn. bei 80°	80°, dann 20°	20°	40°	40°, dann 0°	0°
$^1/_{20}$ bis $^1/_{60}$ . .	—	—	—	—	—	—
$^1/_{100}$	+	+	—	—	—	—
$^1/_{150}$	++	+++	—	—	—	—
$^1/_{200}$	+++	+++	—	—	—	—
$^1/_{250}$	—	—	—	+++	+++	—
$^1/_{300}$	—	—[2]	+++	—	—[2]	+
$^1/_{350}$	—	—[2]	++	—	—[2]	++
$^1/_{400}$	—	—[2]	++	—	—[2]	++
$^1/_{500}$ bis $^1/_{\infty}$.	—	—	—	—	—	—

erfolgt, und daß nach 24stündigem Verweilen bei 40° keine Reversion eintritt, sondern der 40°-Typus sich einfach dem 0°-Typus superponiert, so daß nun die Ausflockung von $^1/_{250}$ bis $^1/_{400}$ Proz. reicht. Die gleiche Erscheinung ist bei Erhöhung der Temperatur von 20 auf 60° zu beobachten. Beim Herabgehen der Temperatur von 80 auf 20° oder von 40 auf 0° tritt keine Änderung ein.

---

[1]) Hier wäre Umkehrung eingetreten, wenn die Bakterien nicht gekocht worden wären.

[2]) Hier wäre Ausflockung eingetreten, wenn nicht die Behandlung bei höherer Temperatur vorangegangen wäre.

Erklärungsversuche für diese Erscheinung.

Nach dem Mitgeteilten wird der Typus der Ausflockung negativer organischer Kolloide durch Farbstoffe beim Ansteigen der Temperatur z. B. von 0 auf 40° durchaus verändert, während das Absinken z. B. von 40 auf 0° ohne Einfluß ist. In der Ausflockungszone besteht offenbar eine Bindung zwischen beiden Kolloiden. Werden die beiden entgegengesetzt geladenen Kolloide in einem solchen Verhältnis gemischt, daß keine Ausflockung eintritt, und nun ein elektrischer Strom durchgeschickt, so wandert das im Überschuß vorhandene Kolloid nach seiner Elektrode und führt das in geringer Menge vorhandene mit sich. Beide Kolloide müssen sonach miteinander verbunden sein, wenngleich sonst kein Anzeichen dafür gegeben ist.

Nehmen wir weiter beispielshalber an, daß es sich um einen Eiweißkörper handelt, der sich gegen Temperatursteigerung so verhält, wie Bakterien gegen Nachtblau, und nehmen weiter an, daß die Aggregate des Eiweißkörpers beim Hinaufgehen der Temperatur von 0° auf 40° nicht verändert werden, hingegen die Aggregate der Nachtblaulösung zerfallen und kleiner werden, so ist klar, daß, falls jedes Eiweißaggregat bei 0° eine bestimmte Zahl, z. B. zwei Nachtblauaggregate absorbierte, es bei 40° mehr, z. B. vier solche Aggregate absorbieren wird. Nun mögen vier solche kleineren Nachtblauaggregate nicht zur Ausflockung ausreichen, dazu mögen, da das Optimum bei 8 liegt, 6 bis 12 erforderlich sein. Entsprach daher das Optimum der Ausflockung bei 0° einer $^1/_{200}$ proz. Nachtblaulösung, so wird bei 40° eine doppelt so hohe Konzentration, $^1/_{100}$ Proz., erforderlich sein[1]).

Wenn nach der Ausflockung bei 0° die Temperatur auf 40° erhöht wird, so besteht kein Hindernis, daß sich von der freiliegenden Oberfläche der Nachtblauaggregate kleinere Aggregate loslösen; die so entstandenen Tochteraggregate verteilen sich auf die Eiweißaggregate unter Veränderung des Ausflockungstypus zu dem für 40° geltenden, d. h. es kommt zu Zerfall der Flocken, da bei $^1/_{200}$ Proz. bloß vier Farbstoffaggregate auf jedes Eiweißaggregat kommen. Bei $^1/_{100}$ Proz. aber wird Ausflockung eintreten, weil dann je acht auf ein Eiweißaggregat einwirken können. Beim Herabgehen der Temperatur von 40 auf 0° bleiben die acht

[1]) Wir verkennen nicht, daß bei Steigerung der Konzentration eine Neigung zur Vergrößerung der Aggregate besteht, so daß das hypothetische Optimum bei $^1/_{150}$ Proz. statt $^1/_{100}$ liegen könnte. Doch war es bei obiger Darlegung nicht notwendig, auch diesen Punkt in Rechnung zu ziehen.

an jedem Eiweißaggregat anhaftenden Farbstoffaggregate einzeln an dieses gebunden und sind daher unfähig, größere Aggregate unter sich zu bilden. Daher bleibt der Typus der Ausflockung unverändert und geht nicht in den 0°-Typus über.

Nach dieser Auffassung könnte sich der Ausflockungstypus bei Temperatursteigerung ändern, ohne daß ein Zerfall der Verbindung beider Kolloide vorauszugehen brauchte, während bei Temperaturabnahme erst ein Zerfall der schon vorhandenen Verbindung und eine neuerliche Bindung von etwas anderem Charakter erfolgen müßte, damit sich der Ausflockungstypus ändert.

Es bliebe noch die Superposition des 40°-Typus über den 0°-Typus zu besprechen, wie sie bei gekochten Bakterien und wahrscheinlich auch beim Eiereiweiß als Folge der Temperatursteigerung zu beobachten ist; doch möchten wir zunächst auf eine Deutung dieser Erscheinung verzichten.

Diese Versuche über Reversion weisen anscheinend darauf hin, daß in der Färberei eine bessere Fixation und Waschbeständigkeit erreicht wird, wenn das Färben bei höherer Temperatur ausgeführt wird. Tatsächlich wird das Färben, abgesehen von dem Fall, daß es sich um eine Diazotierung auf der Faser handelt, bei erhöhter Temperatur ausgeführt, um die Aufnahme des Farbstoffs zu beschleunigen, und wir wissen nicht, ob dabei jemals die Fixation in Betracht gezogen worden ist. Wir haben in den gebräuchlichen Lehrbüchern über Färberei nach einem sicheren Hinweis gesucht und nur folgende wichtige Bemerkung von Georgiewicz[1]) gefunden, die sich auf die Wirkung basischer Farbstoffe, auf mit Farbsäure oder Fettsäuren gebeizte Baumwollfaser bezieht: „Manche Färber ziehen es vor, ohne Erwärmen zu färben, da so glänzendere Farben erhalten werden; doch sind diese nicht so gut fixiert, wie bei Anwendung des Wärmeverfahrens (60°) und die Methode ist daher nur für hellere und mittlere Nuancen zu empfehlen.“

In den angeführten Versuchen wurde die Temperatur während der ganzen Beobachtungszeit konstant erhalten: die Tatsache, daß das Herabgehen der Temperatur keine Änderung des Ausflockungstypus bedingt, weist darauf hin, daß es zur Erreichung des Wärmetypus genügen dürfte, die zwei Kolloide bei der betreffenden Temperatur, 60 bis 80°, zu mischen, die Proben nach einigen Minuten aus dem Wasserbade herauszunehmen und bei 20°

---

[1]) Chemical technology of textile fibres, p. 145.

sich selbst zu überlassen. Tabelle XIII spricht für die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung, doch reicht die Zahl der Versuche nicht zur Sicherstellung dieses Punktes aus.

Tabelle XIII. Colibazillen.

Nachtblau Proz.	Kontrollversuche 20° 24 Stdn.	Kontrollversuche 60° 2 Stdn.	Gemischt bei 60°, in 5 Min. auf 20° abgekühlt, 24 Stdn. Stehen	Janusgrün Proz.	Kontrollversuche 20° 24 Stdn.	Kontrollversuche 60° 2 Stdn.	Gemischt bei 60° in 5 Min. abgekühlt auf 20°, 24 Stdn. Stehen
$^1/_{50}$ . . .	—	—	—	$^1/_{50}$ . . .	—	—	—
$^1/_{100}$ . .	—	++	+++	$^1/_{100}$ . .	—	+++	+++
$^1/_{150}$ . .	+++	—	—	$^1/_{150}$ . .	—	—	—
$^1/_{200}$ . .	+++	—	—	$^1/_{200}$ . .	+++	—	—
$^1/_{250}$ . .	—	—	—	$^1/_{250}$ . .	+++	—	—

Man darf aus der Tabelle schließen, daß die Verbindung der zwei Kolloide, wenigstens in der Wärme, fast augenblicklich erfolgt, die eigentliche Ausflockung aber langsamer zustande kommt.

Schlußfolgerungen.

1. Ausflockung durch Farbstoffe.

a) Zur Ausflockung negativer organischer Kolloide bedarf es um so mehr Farbstoff, je höher die Temperatur ist.

b) Der progressive Mehrbedarf an Farbstoff bei Temperaturerhöhung ist bei reversiblen Kolloiden viel größer als bei irreversiblen.

c) Bei anorganischen Kolloiden fehlt er.

2. Ausflockung durch basische Hydroxyde.

Die Menge an basischem Hydroxyd, die nötig ist zur Ausflockung negativer organischer Kolloide, ist von der Temperatur unabhängig. Mastix bildet anscheinend eine Ausnahme.

3. Reversion der Ausflockung von organischen Kolloiden durch Farbstoffe.

a) Bei Erhöhung der Temperatur kann der für eine niedrigere Temperatur geltende Ausflockungstypus gänzlich in den für eine höhere Temperatur geltenden übergeführt werden.

b) Erniedrigung der Temperatur ändert den Ausflockungstypus nicht.

XXXVII.

Der chemische Nachweis der degenerativen Nervenkrankheiten.

Bildung von Alkylaminen.

Von **Koloman Bauer**, Landeschemiker.

(Aus dem Laboratorium der chemischen Landesanstalt in Budapest.)

Die Lecithine, diese kompliziert aufgebauten chemischen Typen, sind in unserem Organismus weit verbreitet und dies läßt auf ihre hohe Wichtigkeit schließen. Im tierischen Organismus ist besonders die Nervensubstanz reich an Verbindungen von lecithinartigem Charakter. So fand Chevalier[1]) z. B. im Nervus ischiadicus des Menschen nahezu 33 Proz. von diesen Verbindungen. Sie sind aber auch in anderen Geweben und Gewebssäften nachweisbar, denn sie bilden einen primären, nie fehlenden Bestandteil jeder Zelle. Es kann aber keinem Zweifel unterliegen, daß die Lecithine eine besonders aktive Rolle im Nervenleben spielen, da Hirn, Rückenmark und Nerven einen besonderen Lecithinreichtum aufweisen. Peritz[2]) kam jüngst auf Grund seiner an Menschen gemachten Versuche zu der Annahme, daß die schweren Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie Tabes und Paralyse, infolge von Lecithinmangel entstehen. Nach Serono und Percival[3]) ist das Trimethylamin ein Bestandteil des normalen Harns und wird von ihnen für ein Spaltungsprodukt der Lecithine gehalten. Die fettspaltenden Fermente wirken auf das Lecithin[4]) in ähnlicher Weise wie auf die Fette; es entstehen freie Fettsäuren, Glycerinphosphorsäure und Cholin, welch letzteres bekanntlich unter der Einwirkung verschiedener Agenzien Trimethylamin gibt. So zerfällt es in wässeriger Lösung in Glykol und Trimethylamin. Nach Wurtz[5])

entstehen beim Erwärmen einer konzentrierten Cholinchloridlösung Trimethylamin, Äthylenglykol und in geringer Menge Äthylenoxyd.

Harnack[6]) gewann bei der Destillation von Cholin und seines Chlorids außer Trimethylamin noch einen anderen Körper, welchen er für Oxäthyldimethylamin hält.

Nothnagel[7]) machte das Verhalten des Cholins gegen Wärme zum Gegenstand eingehenden Studiums. Bei Beginn der Destillation einer vierprozentigen wässerigen Cholinlösung bemerkte er keine Zersetzung, mit zunehmender Konzentration gingen aber verhältnismäßig große Mengen von Trimethylamin, eine Verbindung von aldehydartigem Charakter und eine Base über.

Eine genügend konzentrierte Lösung von Cholinchlorid gibt bei Zimmertemperatur nur Trimethylamin. Dasselbe Produkt entsteht nach Nothnagel, wenn eine Lösung von Cholinchlorid mit Barytwasser gekocht wird.

Weiss[8]) machte die Beobachtung, daß bei gelindem Erwärmen einer Cholinchloridlösung mit Schwefelsäure ebenfalls Trimethylamin entsteht.

Auch bildet bekanntlich das Trimethylamin den Ausgangspunkt für die künstliche Synthese des Cholins, indem man auf die wässerige Lösung des ersteren Äthylenoxyd einwirken läßt.

Die hier aufgezählten Reaktionen lassen es vermuten, daß das im Harn vorkommende tertiäre Amin durch Zersetzung des Cholins bzw. des Lecithins entsteht. Diese Auffassung wird gestützt durch den Umstand, daß im Organismus außer Lecithin nur wenig solche Verbindungen sich vorfinden, welche als Zersetzungsprodukt Trimethylamin im Harn ergeben könnten. Eine solche wäre das nach Brieger im Hirn normal vorkommende Neuridin, welches mit Alkalien gekocht Dimethyl- und Trimethylamin gibt. Die in letzterer Zeit aufgefundene Fleischbase, das Carnitin, welches als Cholinderivat betrachtet werden kann, ist ebenfalls hierher zu rechnen. Nach Krimberg[9]) wurde dieser Körper nicht nur in Fleischextrakten angetroffen, sondern auch im Muskelgewebe des geschlachteten Tieres. Mit Barytwasser gekocht, wird sein gesamter Stickstoff in Form von Trimethylamin abgegeben.

Das Trimethylamin kann auch als Zersetzungsprodukt bei vorgeschrittener Eiweißfäulnis erscheinen, wie dies durch Brieger an faulenden Leichen beobachtet wurde. In Übereinstimmung hiermit steht die Beobachtung Kulneffs[10]), der im Kot und erbrochenem Mageninhalt neben Äthylendiamin auch Trimethylamin nachweisen konnte. Daß ein Teil des Trimethylamins, welches in

Harn vorhanden ist, aus Lecithin entsteht, beweisen die von Filippo de Filippi[15]) an Menschen gemachten Versuche, laut welchen die ausgeschiedene Menge von Trimethylamin von der dem Organismus zugeführten Lecithinmenge abhängig ist.

Die Versuche wurden an einem 41 Jahre alten Manne von 80 kg Körpergewicht vorgenommen. Um eine Vergleichung zu ermöglichen, teile ich seine Ergebnisse mit:

Periode	Tag	Diät	Harn ccm	Trimethylamin g
I.	1.	Milch, Brot, Suppe, Bohnen	890	0,016 52
	2.	" " " "	835	0,023 60
II.	3.	Milch, Brot, Suppe, Bohnen, 12 Eidotter	965	0,044 25
	4.	" " " " 12 "	1300	0,053 10
III.	5.	wie am ersten Tage	815	0,018 80
	6.—7.	" " " "	—	—
IV.	8.	wie am dritten Tage, 500 g Fleisch	1530	0,079 06
	9.	" " " " 500 " "	1150	—
V.	10.	wie am ersten Tage	1105	0,062 54

Wie aus dieser Zusammenstellung ersichtlich ist, wurden die Versuche zehn Tage hindurch in fünf Perioden angestellt. Die Nahrung bestand aus Milch, Brot, Makkaroni, Suppe, Bohnen, Eidotter und Rindfleisch. Die gemessenen Harnmengen variierten zwischen 815 und 1530 ccm. Die tägliche Trimethylaminmenge betrug 0,016 52 bis 0,079 06 g. Nach dem Genuß von Eidotter beobachtete de Filippi ein auffallendes Steigen des Amingehaltes. Dieselbe Erscheinung trat auch bei Fleischgenuß ein. Das Versuchsindividuum verrichtete keinerlei anstrengende körperliche Arbeiten. Von geistigen Getränken wird nichts erwähnt.

Nach der Aufnahme von 12 Eidottern stieg die ausgeschiedene Trimethylaminmenge am folgenden Tage auf 53 mg, während sie anfänglich nur 16 bis 23 mg betrug. Auf 500 g Fleisch stieg sogar diese Zahl auf 79 an.

Was nun die Nervenkrankheiten anbelangt, besonders jene, wo es sich um organische, degenerative Prozesse, also um Zerfall der Nervenelemente handelt, erschien es mir hier von Interesse, die Mengen des ausgeschiedenen Trimethylamins zu bestimmen, da bei diesen Krankheitsprozessen ein gesteigerter Lecithinzerfall anzunehmen ist.

Bei Zerstörungen in phosphorreichen Geweben, wie Hirn, Rückenmark und Nerven, erscheint der Phosphor in gesteigerter Menge in den Exkrementen. Jüngst wurden von Donath[11]) Zerfallsprodukte des Lecithins auch in der Cerebrospinalflüssigkeit von Nervenkranken nachgewiesen und zwar sowohl bei Epilepsie als

auch bei unzweifelhaft organischen Nervenkrankheiten. Auch fand Donath in zwei Fällen (Tabes dorsalis und Jacksonsche Epilepsie) Lecithin und bemerkt, daß es wahrscheinlich ein pathologisches Produkt darstelle, welches auf ein rapides Zugrundegehen des Nervenbestandes deutet. Was das von Donath in der Cerebrospinalflüssigkeit mit dem Nesslerschen Reagens nachgewiesene Ammoniak anlangt, so konnte man daran denken, daß bei dieser Farbenreaktion auch das vom Cholin abgespaltene Trimethylamin mitwirkt, eine Vermutung, welche ihre Stütze auch darin findet, daß die fragliche Farbenreaktion nicht die für die Ammoniumsalze charakteristische bräunliche Färbung, sondern — besonders in einzelnen Fällen — einen an Intensität zunehmenden zitronenfarbenen Ton aufweist. Ich glaube, daß wir es in diesem Falle mit dem noch im Liquor anwesenden Cholin zu tun haben, welches mit dem Nesslerschen Reagens einen Niederschlag gibt und zwar von hellgelber Farbe. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß Ammoniumsalze in der Cerebrospinalflüssigkeit anwesend sind, die aber nichts destoweniger als pathologisch aufgefaßt werden müssen, da die einschlägige Literatur, einen einzigen Fall ausgenommen, nichts darüber erwähnt, daß im normalen Liquor Ammoniak vorkommt. Über diesen einzigen Fall berichtet Ch. Robin, der in einem Liquor, der infolge einer Stichverletzung durch fünf Tage aus dem Ohre träufelte, 0,02 Proz. Ammoniak nachwies.

Wenn daher die Cerebrospinalflüssigkeit bei Degenerationsprozessen Alkylamine aufweisen kann, so muß ein genetischer Zusammenhang zwischen Ammoniak und Aminbasen existieren, derart, daß die Entmethylierung der tertiären Basen bis zu Ammoniak fortschreitet. Diese Voraussetzung findet eine Stütze in dem Umstand, daß es Hasebroeck[12]) gelungen ist, durch Einwirkenlassen von Schlammbakterien aus Cholin nebst Kohlensäure, Methan, Methylamin und Ammoniak darzustellen. Hier fand eine Entmethylierung zu Ammoniak statt und wenn diese Reaktion auch nicht quantitativ abläuft — es bleibt ein Teil des Methylamins unverändert —, ist sie immerhin als überwiegend zu bezeichnen.

Demgemäß scheint es, daß die Cerebrospinalflüssigkeit bei destruierenden Prozessen des Zentralnervensystems Trimethylamin oder andere Alkylamine enthalten muß, während unter normalen Verhältnissen dies nicht vorauszusetzen ist.

Bei solchen destruierenden Prozessen habe ich in allen Fällen ein Ammoniumsalz in der Cerebrospinalflüssigkeit vorgefunden und zwar in größerer Menge, als dasselbe in normalen Gewebssäften

vorzukommen pflegt, und ich bin bezüglich seines Ursprungs anzunehmen geneigt, daß dieses Ammoniumsalz auf indirektem Wege aus dem Cholin entsteht; es spaltet sich von letzterem Trimethylamin ab, welches zum Teil in Ammoniak übergeführt und als solches oder als Harnstoff ausgeschieden wird. Demzufolge wäre nach Lecithin- oder Cholinverabreichung ein Steigen des Ammoniak- oder Harnstoffgehaltes im Harn zu erwarten. Es wurden in dieser Richtung Stoffwechseluntersuchungen veröffentlicht, welche jedoch eine allzu große Divergenz der Daten aufweisen. Slowtzoff[13]) fand während der Versuchsperiode die Ammoniakmenge erhöht, in einem Falle sogar um das Doppelte. Der Harnstoff scheint dagegen nicht zugenommen zu haben. Es wurde vielmehr ein verminderter Zerfall der Proteïne bzw. eine gewisse Retention des Harnstoffstickstoffs beobachtet. Trotz seiner ins einzelne gehenden Zusammenstellungen können wir die auf eine Retention schließenden Folgerungen Slowtzoffs nicht als erwiesen erachten, da die Zahlen, aus denen die Mittelwerte berechnet wurden, zu starke Abweichungen aufweisen.

So ist aus Tabelle V (S. 380) ersichtlich, daß der in der Vorperiode binnen 24 Stunden abgesonderte Harnstoffstickstoff am ersten Tage 16,330 g beträgt, während der letzte Tag derselben Vorperiode 9,694 g aufweist. Dies sind Abweichungen solchen Grades, welche eine Mittelwertberechnung unzulässig machen. Dasselbe treffen wir bei der IX. tabellarischen Übersicht an (S. 383). Tabelle XIII hingegen weist gar keine oder nur eine so geringe Retention von Harnstoffstickstoff auf, daß man aus ihnen wieder eine Retention nicht erschließen kann. Ich glaube, daß aus den Lecithinversuchen Slowtzoffs keine Retention des Harnstoffstickstoffs hervorgeht, indem sogar in vielen Fällen nach Abbrechen der Lecithinzufuhr eine gesteigerte Stickstoffausscheidung auftritt, da zur Entmethylierung des Cholins zu Ammoniak und zur Umwandlung des letzteren in Carbamid eine gewisse Zeit erforderlich ist. Dies ist die Ursache davon, daß auf Tabelle V in der Nachperiode 13,636 und 13,619 g Harnstoffstickstoff auftreten, mithin höhere Werte als in der Vorperiode (den ersten Tag ausgenommen). Solch hohen Werten begegnen wir selbst während der Lecithinverabreichung nicht. Dasselbe sehen wir zum Teil auch auf Tabelle XIII.

Ich gehe nun auf meine Versuche über.

Experimenteller Teil.

Prüfung des Harns und Kotes auf Trimethylamin und Bewertung der quantitativen Bestimmungsmethoden.

Laut Vorschrift des Filippo de Filippischen Verfahrens wurden 33 Liter Menschenharn verschiedenen Ursprungs anfangs über freier Flamme, dann auf dem Wasserbade auf etwa 3 Liter

eingedampft. Die eingeengte Flüssigkeit wurde von den ausgeschiedenen phosphorsauren Salzen durch Filtrieren befreit, nachdem der mit Salzsäure versetzte Harn neutralisiert worden war. Hierauf wurden behufs Entfernung der überwiegenden Menge des Harnstoffs 375 g reine Oxalsäure zugesetzt und nach der am nächsten Tage vorgenommenen Filtration alkalisch gemacht, schließlich in Fraktionen von je 1 Liter in dreifach verdünnte Salzsäure überdestilliert. Die rosa gefärbten Destillate von knoblauchartigem Geruch wurden zusammengegossen und auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mehrmals mit absolutem Alkohol extrahiert, wodurch derselbe vom größten Teile des Chlorammoniums befreit wurde. Die Masse, welche nunmehr aus dem Gemenge der drei Amine und ein wenig Ammoniumsalz bestand, wurde in etwas Wasser gelöst und in den Kolben eines Destillierapparates gewaschen, wo sie mit Hilfe von Natriumhypobromit oxydiert wurde. Der alkalisch gemachte Inhalt des Kolbens wurde einer abermaligen Destillation unterworfen, die überdestillierende reine tertiäre Base in Salzsäure aufgefangen und diese Lösung zur Trockne eingedampft. Die absolutalkoholische konzentrierte Lösung des Rückstandes wurde mit einer alkoholisch-ätherischen Platinchloridlösung versetzt und mehrmals umkristallisiert. Das orangerote, getrocknete Chloroplatinat ergab:

I. Platin 37,41 Proz.,
II. „ 37,23 „ Berechnet: 36,92 Proz.

Die Behauptung Filippo de Filippis, daß im Harn ein tertiäres Amin und zwar ausschließlich Trimethylamin vorkommt, kann ich sonach nur bestätigen.

Behufs Untersuchung der Fäces wurden ungefähr 450 g frischen Kots mit zweiprozentiger Schwefelsäure zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde pulverisiert, mehrmals mit warmem Wasser extrahiert und die alkalisch gemachten Extrakte abdestilliert. Behufs Isolierung des Trimethylamins wurde die in Salzsäure aufgefangene Substanz ähnlich behandelt, wie es oben bei der Harnuntersuchung beschrieben worden ist. In keiner einzigen der drei Kotproben verschiedenen Ursprungs konnten auch nur Spuren von Trimethylamin nachgewiesen werden. Der Geruch des getrockneten Rückstandes des alkoholischen Extraktes ließ nicht auf die Anwesenheit einer Base schließen. Der in wenig absolutem Alkohol gelöste Rückstand zeigte nach Versetzen mit alkoholisch-ätherischer Platinchloridlösung selbst nach 48 stündigem Stehen keine

Trübung. Hiernach kann beim Menschen die Untersuchung des Kotes entfallen.

Bevor ich auf die Untersuchungen am Harn übergehe, möchte ich die Verläßlichkeit der de Filippischen Methode dartun.

Daß die primären und sekundären Basen samt dem Chlorammonium durch Natriumhypobromit zerstört werden, das tertiäre Amin hingegen unangegriffen bleibt, ist aus folgenden Tabellen ersichtlich, wobei stets 50 ccm Natriumhypobromit zur Oxydation angewendet wurden.

Verbindung	g	Überdestillierte Base g	Berechnet als entsprechendes Chlorhydrat Proz.
Chlorammonium	0,5004	0,0001	0,01
Methylaminchlorhydrat	0,1388	0,0003	0,21
Dimethylaminchlorhydrat . . .	0,2213	0,0008	0,36
Diäthylaminchlorhydrat	0,2000	—	—

Um auch das Verhalten des Trimethylamins kennen zu lernen, wurde ein Gemisch von Methyl-, Dimethyl-, Diäthyl- und Trimethylaminchlorhydrat mit Chlorammonium untersucht. Das Gemisch dieser vier bzw. drei Aminchloride und der geringen Menge von Chlorammonium wurde in etwas Wasser gelöst und quantitativ in den Kolben eines Destillierapparates gewaschen. Danach wurde mit Natriumhypobromit oxydiert.

I. Es wurden abgewogen:

0,0654 g Methylaminchlorhydrat,
0,0668 „ Dimethylaminchlorhydrat,
0,0741 „ Diäthylaminchlorhydrat,
1,3662 „ Trimethylaminchlorhydrat,
0,1648 „ Chlorammonium.

Der Trockenrückstand des überdestillierten salzsauren Trimethylamins betrug 1,3608 g. Somit beläuft sich der Verlust auf nur 0,40 Proz. Dieses Aminchlorid wurde nun in absolutem Alkohol mit einem Überschuß von alkoholisch-ätherischer Platinchloridlösung gefällt. Im gewaschenen und getrockneten Platindoppelsalz wurden 37,54 Proz. metallisches Platin gefunden (berechnet 36,9 Proz.).

II. Es wurden abgewogen:

0,0863 g Methylaminchlorhydrat,
0,0822 „ Diäthylaminchlorhydrat,
1,3298 „ Trimethylaminchlorhydrat,
1,1074 „ Chlorammonium.

Gewicht des trockenen Rückstandes . . . 1,3200 g.
Verlust . . . . 0,72 Proz.
Das Chloroplatinat enthält . . . . 37,64 Proz. Metall.

Wir sind mithin in der Lage, das Trimethylamin im Harn mit ziemlicher Genauigkeit zu bestimmen, unbekümmert darum, ob neben dieser Verbindung etwa noch andere Amine vorhanden sein mögen. Die Annahme Filippo de Filippis, daß im Harn neben Trimethylamin noch andere primäre und sekundäre Amine vorkommen, kann also keine Störung verursachen.

Das Ziel meiner nun vorgenommenen Arbeiten war, festzustellen, wie groß die unter möglichst normalen Verhältnissen ausgeschiedene Menge des Trimethylamins ist und ob bei Zufuhr von Lecithin eine gesteigerte Trimethylaminausscheidung zu beobachten ist.

Versuch. 36 Jahre alter Laborant von mittlerer Körpergröße, von gesundem Aussehen und normaler Lebensweise. Während des Versuches genoß er Milch, Rindfleisch, Gemüse und ohne Ei zubereitete Mehlspeisen. In seinem Kote konnte in keinem einzigen Falle die Anwesenheit von Trimethylamin zweifellos nachgewiesen oder dasselbe identifiziert werden. Die unten angegebenen Bestimmungen wurden in einer 24 stündigen Harnmenge vorgenommen. Im Harn wurden keine pathologische Bestandteile gefunden. Die Mengen des ausgeschiedenen Trimethylamins sind in folgender Tabelle verzeichnet.

Datum	Diät	Harn ccm	Spez. Gewicht	Trimethylamin g	Trimethylamin aus 1000 ccm Harn g
28. Jan.	Milch, Kaffee, Fleisch, Gemüse	1280	1025	0,0188	0,0146
29. "	" " " "	1500	1026	0,0183	0,0122
30. "	" " " "	1420	1024	0,0400	0,0281
31. "	wie am ersten Tage, 16 Eier	2220	1019	0,0236	0,0106
1. Febr.	wie am ersten Tage	1940	1022	0,0698	0,0359
2. "	" " " "	1440	1025	0,0426	0,0295
4. "	" " " "	1420	1026	0,0264	0,0114

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß das Maximum der Trimethylaminausscheidung im Harn am fünften Tage stattfand, und zwar nachdem tags zuvor 16 Eier genossen wurden. Die täglich ausgeschiedenen Mengen (18 bis 26 mg) der tertiären Base stimmen mit den Angaben Filippo de Filippis, den 30. Januar ausgenommen, an welchem Tage das Versuchsindividuum eine ungewohnte, schwere körperliche Arbeit (Schneeschaufeln) verrichten mußte, außerdem ungefähr 1 Liter Wein zu sich genommen hatte. In diesem Falle mag das Mehr von Muskelarbeit, vielleicht auch der Alkohol zur vermehrten Trimethylaminausscheidung beigetragen haben. Es wäre der Mühe wert, sich mit dieser Frage eingehender zu beschäftigen.

Filippo de Filippi schaltete das Fleisch in der Diät so lange aus, bis er feststellen konnte, daß eine Zunahme des Trimethylamins im Harn auf einen gesteigerten Zerfall des in Form von Eiern einverleibten Lecithins schließen läßt. Ich hielt die möglichst normale Nahrungszufuhr, Fleisch inbegriffen, für zweckmäßiger. Dieses Vorgehen bewährte sich, indem es gelang, nach Eiertagen das Trimethylamin in viel größerer Menge zu erhalten.

Das Resultat meiner bisherigen Versuche lautet, daß es gelungen ist, das Trimethylamin im Harn zu isolieren und in zweifelloser Weise zu identifizieren. Es ist ferner anzunehmen, daß der gesteigerte Lecithinzerfall im Organismus eine Zunahme der Trimethylaminausscheidung verursacht. Dasselbe scheint für anstrengende körperliche Arbeit zu gelten. Schließlich habe ich die quantitative Bestimmungsmethode der Basen verläßlich gefunden.

Die Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit auf Trimethylamin.

Zu diesem Zweck habe ich mehrere Methoden angewandt, leider jedoch mit nicht befriedigenden Resultaten.

I. Der mit Salzsäure schwach angesäuerte Liquor wurde zur Trockne eingedampft, die wässerige Lösung des Rückstandes mit überschüssiger Lauge versetzt und abdestilliert. Wenn die Lösung Ammoniak und destillierbares Trimethylamin enthält, so zeigt dieselbe beim Versetzen mit dem Nesslerschen Reagens eine Gelbfärbung, welche jedoch ebenso vom Ammoniak, wie vom Trimethylamin herrühren kann. In diesem Falle zerstören wir die Ammoniumsalze mit Natriumhypobromit und dann ist die überdestillierende Base Trimethylamin. Die nun erfolgende Nessler-Reaktion zeigt also nur Trimethylamin. In der Tat bekam ich in zwei Fällen im Liquor einen positiven Ausfall der Reaktion, welche also unzweifelhaft auf eine tertiäre Base hinweist.

Es standen mir zur Verfügung 78 ccm Cerebrospinalflüssigkeit von Paralytikern. Das alkalisch gemachte Destillat gab mit dem Nesslerschen Reagens eine intensive, gelbe Färbung, während der ursprüngliche Liquor mit demselben Reagens sich allmählich immer stärker zitronengelb färbte. Im Destillate verursachte Natriumhypobromit eine starke Gasentwickelung, was auf Anwesenheit von relativ großen Mengen Ammoniumsalz deutet. Die durch abermaliges

Destillieren erhaltene Flüssigkeit wies gleichfalls die allmählich zunehmende Gelbfärbung auf. Das Dunklerwerden des Farbentones ist bei Ammoniumsalzen nicht zu beobachten, dieser Niederschlag ist von rötlicher Färbung, während Trimethylamin eine immer intensiver werdende Gelbfärbung gibt.

II. Es wurde ferner ein Versuch nach der von Tsalapatani[14]) empfohlenen Methode zum Nachweis von Trimethylamin in der Cerebrospinalflüssigkeit angestellt. Der mit Lauge versetzte Liquor wurde destilliert und die übergehenden Dämpfe in Salzsäure aufgefangen. Die so erhaltene Lösung wurde am Wasserbade eingedampft, in 95 proz. Alkohol gelöst und mit einigen Centigramm Tetrachlorchinon versetzt. Bei einer Temperatur von 70 bis 74° C trat nach längerer Zeit eine ganz schwache Violettfärbung ein, welche am folgenden Tage intensiver wurde. Diese Methode erwies sich für meine Zwecke als ungeeignet, da reines Chlorammonium unter denselben Umständen eine ähnliche Farbenreaktion gibt. Selbst das Tetrachlorchinon ist imstande, diese Färbung aufzuweisen, wenn es nach längerem Stehen in ammoniakhaltiger Atmosphäre mit absolutem Alkohol versetzt und auf dem Wasserbade erwärmt wird. Nach Tsalapatani verursachte Ammoniak unter denselben Bedingungen keine Färbung. In Widerspruch steht hiermit die Tatsache, daß in der alkoholischen Lösung von Tetrachlorchinon mit wässerigem Ammoniak ein Substitutionsprodukt, das Chloranilamid, $C_6Cl_2O_2(NH_2)_2$, ohne Alkohol hingegen Chloranilaminsäure, $C_6Cl_2(NH_2)(OH)O_2$, entsteht. In der Eprouvette zeigt das Tetrachlorchinon mit wässerigem Ammoniak eine Violettfärbung, während bei Gegenwart von Alkohol die Lösung sich kirschrot färbt. Es folgt hieraus, daß chemisch reines Trimethylamin mit Tetrachlorchinon keine Farbenreaktion gibt und infolgedessen bei der Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit als Reagens nicht zu gebrauchen ist.

III. Auf Vorschlag von Prof. J. Donath versuchte ich mit Jod-Jodkalium auf Trimethylamin zu prüfen. Das Reagens zeigt, wie ich mich überzeugt habe, noch einen Gehalt von 0,02 Proz. Trimethylaminchlorhydrat an. Die Reaktion besteht in der Bildung von grauen, an die Farbe des festen Jods erinnernden farnblattförmigen Kristallen, welche mit Lauge versetzt, schon in der Kälte rotes Lackmuspapier bläuendes Trimethylamin entwickeln.

Es standen 102 ccm Liquor von Epileptikern und 105,5 ccm von Rückenmarkschwindsüchtigen zu meiner Verfügung. Der Liquor wurde mit Lauge versetzt, destilliert, die Ammoniumsalze wurden

zerstört und die wässerige Lösung des Rückstandes in oben beschriebener Weise geprüft. Es konnte die Bildung der charakteristischen Kristalle nicht beobachtet werden. Mit Hilfe dieser Methode ist es daher ebenfalls nicht gelungen, tertiäre Aminbasen nachzuweisen.

Die Untersuchung des Harns auf Trimethylamin bei destruierenden Prozessen des Nervensystems.

Die Harne stammen aus der Nervenkrankenabteilung eines hiesigen Krankenhauses. Die 24 stündige Harnmenge wurde in einem Meßzylinder gesammelt, in welchem vorher jedesmal 25 ccm verdünnte Salzsäure gebracht worden war. Der gesammelte Harn wurde einige Stunden, nachdem derselbe gesammelt war, mit Lauge versetzt, destilliert und in oben beschriebener Weise weiter behandelt. Die Fälle waren: Dementia paral. progressiva, Tabes dorsalis, Myelitis acuta, Myelitis chronica und von den funktionellen Nervenkrankheiten ein schwerer und ein leichterer Fall von Neurasthenie.

Die Versuchsergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Datum 1907	Krankheit	Name	Harn ccm	Spez. Gewicht	Trimethylamin g	In 1000 ccm g
14. Febr.	Progressive Paralyse	J. K. 28 j. Mann	2430	1016	0,0509	0,0229
15. „			1410	1021	0,0292	0,0207
16. „			1480	1018	0,0386	0,0260
20. „	Progressive Paralyse	E. F. 30 j. Frau	610	1034	0,0316	0,0518
21. „			430	1031	0,0368	0,0855
26. „	Tabes dorsalis	J. M. 38 j. Mann	1670	1012	0,0415	0,0248
27. „			1230	1015	0,0622	0,0505
28. „			1450	1017	0,0547	0,0376
3. März	Tabes dorsalis	X. X. 52 j. Mann	238	1030	0,0382	0,1605
4. „			220	1028	0,0522	0,2454
5. „			370	1020	0,0540	0,1468
14. „	Myelitis	D. K. 24 j. Mann	1150	1023	0,0702	0,0610
15. „			875	1023	0,0726	0,0829
16. „			950	1022	0,0686	0,0722
11. „	Myelitis	M. F. 22 j. Frau	910	1018	0,0424	0,0465
12. „			720	1017	0,0472	0,0655
14. „			710	1016	0,0572	0,0805
25. „	Neurasthenie	G. G. 29 j. Mann	2020	1016	0,0194	0,0096
26. „			3450	1010	0,0226	0,0065
27. „			2020	1007	0,0247	0,0122
3. April	Neurasthenie	J. B. 32 j. Mann	720	1025	0,0382	0,0530
4. „			980	1020	0,0368	0,0371
5. „			1040	1021	0,0426	0,0409

Zusammenfassung.

Es unterliegt nunmehr keinem Zweifel, daß dem Trimethylamin im normalen Stoffwechsel eine bedeutende Rolle zukommt. Das konstante Vorkommen desselben im Harn ist einwandsfrei nachgewiesen worden. Auf Grund einer Anzahl von Versuchen ist anzunehmen, daß es hauptsächlich der Lecithinzerfall ist, der die überwiegende Menge des Trimethylamins entstehen läßt. Als fernere Ursprungsquellen können vielleicht auch andere, durch die Nahrung zugeführte Cholinkomplexe (Fleischbasen) angesehen werden.

Zur Bestimmung der tertiären Basen steht uns eine brauchbare Methode zur Verfügung; sie ermöglicht eine Trennung des Trimethylamins von anderen Aminen und von den Ammoniumsalzen.

Die von einem gesunden Menschen täglich ausgeschiedene Menge Trimethylamin beträgt bei gemischter Kost 18 bis 26 mg, was in Übereinstimmung steht mit den Angaben Filippo de Filippis, welche er bei fleischfreier lactovegetarischer Diät erhielt. Das unerwartete Ansteigen des ausgeschiedenen Trimethylamins auf 79 mg ist in de Filippis Versuch auf die plötzliche, ziemlich große ($^1/_2$ kg) Fleischzufuhr zurückzuführen, wobei nicht außer Acht zu lassen ist, daß die Cholinkomplexe des Fleisches fast momentan in den bisher bei Milch- und Pflanzennahrung gehaltenen Organismus gelangt sind. Schwere körperliche Arbeit und Genuß von alkoholischen Getränken scheinen ein Anwachsen der Trimethylaminausscheidung herbeizuführen.

Was den chemischen Nachweis der degenerativen Nervenkrankheiten anlangt, ist festgestellt worden, daß die Menge des ausgeschiedenen Trimethylamins von der Krankheitsform abhängig ist; so beträgt die Durchschnittsmenge dieser Verbindung bei Tabes 51, bei Myelitis 59 und bei Paralysis progressiva 37 mg. Klarer ist dies bei einem der zwei angeführten Fälle von Neurasthenie zu ersehen. Der eine Fall läßt auf keine Destruktionen schließen, was mit der pathologischen Anatomie der Neurasthenie in Einklang steht. Beim zweiten Fall beobachten wir gerade das Gegenteil. Weitergehende Folgerungen dürfen jedoch aus diesen zwei Fällen nicht gezogen werden.

Literatur.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 97 (1886).
[2]) Berl. klin. Wochenschr. 2 (1908).
[3]) C. Serono e A. Percival, Giorn. R. Accad. Med., Torino. Vol. Anno LXII, F. 2, 3. — Dessaignes (Lieb. Ann. 218) machte schon 1858

die Erfahrung, daß der menschliche Harn mit fixen Alkalien verhältnismäßig große Mengen von Trimethylamin gibt, welches sich seiner Ansicht nach von kompliziert zusammengesetzten Verbindungen abspaltet. Dies wären die von Kutscher (Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**, 462) jüngst aufgefundenen Cholinbasen, welche mit Alkalien Trimethylamin geben.

[4]) Hier und im folgenden wird der Kürze halber einfach Lecithin gebraucht.

[5]) Compt. rend. **66**, 5772.

[6]) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **4**, 182.

[7]) Arch. d. Pharm. **232**, 277.

[8]) Zeitschr. f. Naturw. Halle **60**, 240.

[9]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**, **49** (1906).

[10]) Berl. klin. Wochenschr. **44** (1891).

[11]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 526 (1903), ferner Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilkunde **27**.

[12]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **12** (1888).

[13]) Diese Beiträge **8**, 370 (1906).

[14]) Bull. Soc. de Stiinte diu Bucaresci **16**, 167—169, Mai-August 1907. Lab. f. med. Chem.

[15]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **49**, 433 (1906).

Zur Nachricht.

Infolge eines von mir angeregten Übereinkommens zwischen den beteiligten Verlagsfirmen verschmelzen vom nächsten (XII.) Bande ab die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ mit der von C. Neuberg redigierten im Verlag von Julius Springer, Berlin, erscheinenden „Biochemischen Zeitschrift“.

Die bisherigen Mitarbeiter der „Beiträge“ haben großenteils der „Biochemischen Zeitschrift“ ihre Mitwirkung zugesichert.

Straßburg, im Juni 1908.

F. Hofmeister.

Verzeichnis der Mitarbeiter des elften Bandes.



